

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA



TESIS

**Sistema de liberación de metotrexato encapsulado en nanotubos Ti-Ni-O
modulada mediante una membrana polimérica de PVA/PNIPAM**

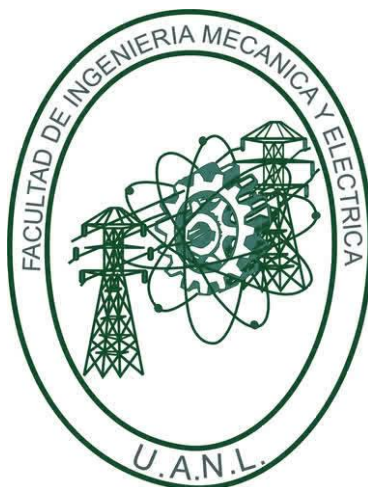
POR

RICARDO DANIEL PARGA MONTEMAYOR

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA CON ORIENTACIÓN
EN NANOTECNOLOGÍA**

OCTUBRE, 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



TESIS

**Sistema de liberación de metotrexato encapsulado en nanotubos Ti-Ni-O
modulada mediante una membrana polimérica de PVA/PNIPAM**

POR

RICARDO DANIEL PARGA MONTEMAYOR

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA CON ORIENTACIÓN
EN NANOTECNOLOGÍA**

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN, MÉXICO

OCTUBRE, 2019

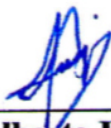
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE INGENIERIA MECÁNICA Y ELÉCTRICA

SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Los miembros del Comité de Tesis recomendamos que la Tesis “Sistema de liberación de metotrexato encapsulado en nanotubos Ti-Ni-O modulada mediante una membrana polimérica de PVA/PNIPAM” Realizada por el alumno(a) Ricardo Daniel Parga Montemayor, con número de matrícula 1525693, sea aceptada para su defensa como opción al grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Nanotecnología.

El comité de tesis



Dr. Luis Alberto López Pavón
Director

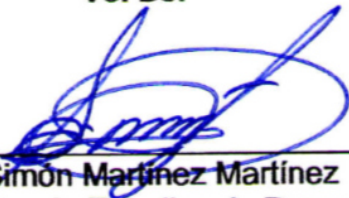


Dr. Iván Eleazar Moreno Cortez
Revisor



Dr. Raúl Lucio Porto
Revisor

Vo. Bo.



Dr. Simón Martínez Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado



Dedicatorias

A mis padres **Nora Leticia Montemayor Cerda** y **Mario Alfonso Parga Camacho** por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo, así como sus consejos y valores los cuales me han llevado a ser la persona que soy en la actualidad.

A mis hermanos: **Mario Alfonso Parga Montemayor**, **Anakaren Leticia Parga Montemayor** y **Héctor Eduardo Parga Montemayor** por el apoyo moral que me brindaron en el transcurso de mi posgrado.

A mis amigos, familiares y todas aquellas personas que aportaron a lo largo de este logro para que pudiera concluirlo.

Agradecimientos

Al **Dr. Luis Alberto López Pavón**, por el apoyo que me ha otorgado durante el desarrollo de esta tesis y su compromiso como director del presente trabajo de investigación.

Al **Dr. Iván Eleazar Moreno Cortez**, por el apoyo profesional que siempre me ha brindado y por haber aceptado formar parte de la comisión de esta tesis.

Al **Dr. Rene Fabián Cienfuegos Peláez**, por prestarme equipo de su laboratorio, le externo mi más sincero agradecimiento, gracias por brindarme su amable amistad.

Al **Dr. Raúl Lucio Porto** por su valiosa colaboración y por el apoyo brindado durante las diferentes etapas del desarrollo de esta investigación.

A la **Universidad Autónoma de Nuevo León** y a la **Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica**, por abrirme las puertas de sus instalaciones para el desarrollo de esta tesis.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por el financiamiento de la beca brindada a mi persona durante el periodo de realización de esta maestría.

A mis compañeros de maestría: **Pablo Granados, Ángel Contreras, Víctor Ortiz, Ángeles Martínez, Alexia Ibarra, Edelin Posada y Cynthia Castro** por transmitir parte de su conocimiento y aportarme su amistad.

A mis compañeros de laboratorio quienes me han dejado enseñanzas a lo largo de este periodo de maestría.

A todos aquellos que contribuyeron directa e indirectamente en este trabajo de tesis.

Índice

Resumen.....	1
1 INTRODUCCIÓN	2
1.1 Justificación	4
1.2 Hipótesis.....	4
1.3 Objetivo	4
1.3.1 Objetivo General	4
1.3.2 Objetivos Específicos.....	4
1.4 Referencias.....	5
2. MARCO TEORICO Y ANTECEDENTES	7
2.1 Padecimiento artritis reumatoide (AR)	7
2.1.1 Fármaco Metotrexato (MTX).....	8
2.1.2 Mecanismo de acción del metotrexato.	8
2.1.3 Desventajas del metotrexato	9
2.1.4 Nanovehículos usados para liberación de metotrexato.	10
2.2 Parte inorgánica del sistema de liberación	14
2.2.1 Aleaciones de titanio.....	14
2.2.1.1 Resistencia a la corrosión	15
2.2.1.2 Biocompatibilidad	15
2.2.1.3 Bioadhesión (Osteointegración).....	16
2.2.1.4 Memoria de forma	17
2.2.2 Nanotubos	18
2.2.2.1 Funcionalización superficial mediante la técnica de anodizado	19
2.2.3 Liberación de fármaco a partir de aleaciones anodizadas con superficies nanoestructuradas	20
2.2.3.1 Liberación de fármacos sensibles a pH y temperatura	21
2.2.3.2 Liberación de fármacos sensibles a la luz.....	22
2.2.3.3 Liberación de fármacos sensibles a la radiofrecuencia	22
2.2.3.4 Liberación de fármacos sensibles a campos magnéticos	23
2.2.3.5 Liberación de fármacos sensibles al ultrasonido	23
2.3 Parte orgánica del sistema de liberación	24
2.3.1 Poli (nisopropilacrilamida) PNIPAM	24
2.3.2 Técnica generadora de nanofibras (Electrohilado)	24

2.3.3 Membranas nanofibrosas	25
2.3.4 Control de liberación por medio de una película polimérica.....	26
2.4 Referencias.....	28
3. TÉCNICAS EXPERIMENTALES	34
3.1 Introducción	34
3.2 Equipos utilizados.....	35
3.2.1 Fuente de voltaje para anodizado.....	35
3.2.2 Equipo de Electrohilado	36
3.2.3 Espectrofotómetro de ultravioleta-visible (UV/Vis).....	37
3.2.4 Microscopio Electrónico de Barrido. (SEM)	38
3.2.5 Dip Coating	39
3.2.6 Cortadoras automática y manual.....	39
3.3 Síntesis de nanotubos	40
3.3.1 Síntesis de nanotubos de titanio y de la aleación de TiNi por anodizado electroquímico	40
3.4 Método de carga para el fármaco metotrexato	42
3.5 Generación de películas por evaporación de solventes.....	43
3.6 Preparación de buffer de fosfato PBS	44
3.7 Síntesis de nanofibras	44
3.7.1 Síntesis de nanofibras por el método de Electrohilado	44
3.7.2 Electrohilado sobre nanotubos	45
3.8 Medición de nanofibras y nanotubos	46
3.9 Liberación de sistemas propuestos.....	46
3.10 Representación gráfica de experimentación	48
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
4.1 Introducción.	49
4.2 Análisis morfológico de los nanotubos	50
4.3 Caracterización de metotrexato.....	54
4.4 Carga de nanotubos con metotrexato	54
4.5 Estudio de la liberación “in vitro” del fármaco metotrexato	55
4.6 Análisis morfológico de nanofibras de PNIPAM/PVA	60
4.7 Electrohilado sobre nanotubos	62
4.8 Estudio de la liberación “in vitro” del fármaco metotrexato, en titanio y aleaciones anodizadas TiNi, encapsulado con nanofibras PVA/PNIPAM	64

4.9 Película polimérica (PVA/PNIPAM)	69
4.10 Estudio de la liberación “in vitro” del fármaco metotrexato encapsulado en nanotubos de titanio y aleaciones anodizadas TiNi modulado mediante una película PVA/PNIPAM	70
4.11 Liberación optima de muestras.....	74
4.12 Morfologías de nanotubos, nanofibras y película polimérica de un mes de liberación.	80
4.13 Referencias.....	82
5. CONCLUSIONES	84

Resumen

A lo largo de la historia médica se ha buscado la manera suministrar agentes externos que ayuden al cuerpo o que mejoren el tiempo de respuesta al cuadro de síntomas por cada padecimiento irregular que presente la salud del paciente. En los últimos 50 años se han utilizado diferentes vías de administración de fármacos, tales como; orales, intravenosa, epitelial, etc..., para cada uno de los miles de padecimientos que pueden presentar el cuerpo humano. Con los últimos avances en el área de la nanotecnología, se han implementado sistemas de liberación local y controlada, aprovechando la morfología nanoestructurada, como los nanotubos o nanoporos, que pueden doparse con medicamentos para su posterior liberación en el área necesaria. En esta investigación, se desarrolla y caracteriza un sistema de liberación controlada del medicamento metotrexato. Este medicamento ataca la condición de la artritis reumatoide (AR). Con la administración local y controlada, es posible disminuir la farmacocinética que presenta el medicamento en todo el cuerpo y, por lo tanto, reducir los efectos secundarios causados por las altas dosis que permanecen en el cuerpo durante meses. El sistema consiste en Ti puro o la aleación de TiNi equiatómica funcionalizada por la técnica de anodización que crea una capa de nanotubos de óxido de titanio que se cargan con el fármaco (MTX), controlando la liberación con una membrana de nanofibra de polímero electrohilado Poli (N-isopropilacrilamida) o PNIPAM. Se toman los tiempos de liberación, además de la caracterización correspondiente de la morfología del sistema de liberación de fármaco. En el presente trabajo, fue posible realizar el sistema de liberación formado por nanotubos, cargados con MTX recubierto con una membrana polimérica PVA/PNIPAM, lo que resultó en una liberación controlada de más de 30 días in vitro.

1 INTRODUCCIÓN

Los problemas con medicamentos convencionales se relacionan principalmente con la solubilidad del fármaco, baja biodistribución, falta de selectividad y farmacocinética desfavorable. Por otra parte, agentes bioactivos como proteínas, ácidos nucleicos, enzimas y genes administrados por vía oral o intravenosa pueden degradarse prematuramente por metabolismo o por condiciones enzimáticas existentes en tratados gastrointestinales. Estos desafíos y el esfuerzo de los investigadores han contribuido al desarrollo de nuevos sistemas de administración de medicamentos para lograr diversos objetivos, como la administración de agentes terapéuticos al sitio deseado, mejorando la biodisponibilidad y la protección del medicamento [1]. Las enfermedades autoinmunes se definen como los ataques al tejido del huésped por parte del sistema inmune. Factores como, desencadenantes genéticos y ambientales (virus, bacterias y otros patógenos infecciosos) juegan un papel en el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Las infecciones están relacionadas con varias enfermedades autoinmunes, por ejemplo, inflamaciones crónicas y desmielinización [2]. La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica compleja caracterizada por aumento de la permeabilidad vascular y la consiguiente invasión de las células inmunes, tales como macrófagos y linfocitos activados, aunque la causa exacta de AR permanece en duda, se ha descubierto que los macrófagos activados desconocidos son las células más prominentes en el articulaciones infladas de pacientes con AR y se cree que hacen una contribución importante a la inflamación articular y daño a las articulaciones patogénesis. Por lo tanto, la orientación de la activación macrófagos y citosinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral ha sido considerada una forma efectiva de aliviar los síntomas de la AR. El metotrexato (MTX) es un medicamento antirreumático modificador del padecimiento, se ha utilizado ampliamente tanto solo y en combinación con productos biológicos para tratar la AR., debido a su extensa distribución aleatoria en el cuerpo, el MTX a menudo causa efectos secundarios graves, como pérdida de cabello, náuseas, dolores de cabeza y pigmentación de la piel. De hecho, la mitad de todos los pacientes tratados con MTX experimentan efectos secundarios, que limitan el uso a largo plazo y la tolerabilidad de este medicamento. Estrategia para superar este desafío es desarrollar nanovehículos para

MTX que se dirigen al medicamento a los macrófagos activados en las regiones inflamadas de la AR y reduce la fracción de la droga alcanzando objetivos toxicológicos [3].

Las aleaciones de Ti, debido a su biocompatibilidad y, propiedades mecánicas tales como; bajo módulo elástico, alta resistencia a la fatiga y excelente resistencia a la corrosión, son ampliamente utilizadas en aplicaciones biomédicas, en especial en articulaciones y en regeneración ósea [4]. Estas aleaciones crean de manera natural, una capa de óxido de pocos nanómetros de espesor, esta capa es totalmente biocompatible y facilita la interacción con el tejido. Existen diversos métodos para ayudar a esta capa a desarrollarse de mayor espesor, nanoporosa o incluso una capa de nanotubos uniformemente distribuidos sobre la superficie de la aleación de Ti, uno de esos métodos es el anodizado. Si se consigue la capa nanoporosa o de nanotubos, estos pueden ser cargados de medicamentos de tal manera que la liberación de medicamento sea en el área que se necesite. Aunado a esto se puede ralentizar esta liberación de medicamento por medio de una membrana polimérica permeable [5]. Los polímeros inteligentes o sensibles al estímulo pueden someterse a cambios físico-químicos en respuesta a diversos estímulos externos: temperatura, luz, pH, aparición de enzimas o iones, desencadenando por campos magnéticos o eléctricos [6-11]. Uno de los polímeros con mayor capacidad de respuesta es la poli n-isopropilacrilamida (PNIPAM), que presenta una temperatura crítica más baja de la solución por sus siglas en inglés (LCST) de 32 ° C. Por debajo de LCST PNIPAM es soluble en agua, pero por encima de la LCST, los puentes de hidrógeno intramoleculares causan la insolubilidad del polímero. Esta propiedad hace que PNIPAM un material atractivo para la liberación de fármacos con temperatura controlada [12].

Como alternativa a las películas poliméricas, las nanofibras pueden jugar un rol muy importante en el control de la liberación de fármaco. Las nanofibras son fibras con diámetros en el rango nanométrico que pueden obtenerse a partir de diferentes soluciones de polímeros mediante diferentes procesos de síntesis. Las nanofibras poliméricas han sido muy utilizadas en biomedicina como biosensores, portadores de fármacos e ingeniería de tejidos principalmente debido a su parecido con la matriz extracelular (MEC) y la gran relación área a volumen. [13,14]. Teniendo en cuenta todas las propiedades de las aleaciones de titanio y el polímero inteligente (PNIPAM), se pasó a realizar el sistema de liberación propuesto con

formado con una capa orgánica(polímero) y una capa inorgánica (nanotubos de aleaciones de titanio) que retendrán y liberarán del fármaco (MTX).

1.1 Justificación

Disminuir los efectos secundarios que presenta el cuerpo afectado por la saturación del MTX, realizando un transporte más eficiente del fármaco mediante un sistema de liberación local usando las propiedades de nanotubos y membranas poliméricas.

1.2 Hipótesis

Es posible la liberación controlada del fármaco Metotrexato encapsulado en nanotubos titanio y aleaciones de TiNi, modulada por una matriz polimérica nanofibrosa y película de Poly(N-isopropylacrylamide) y Polyvinyl alcohol.

1.3 Objetivo

1.3.1 Objetivo General

Desarrollar un sistema de liberación del Metotrexato, conformado por nanotubos de óxido de titanio en una aleación de TiNi o Ti puro realizada por la técnica de anodizado, recubiertos por una membrana polimérica nanofibrosa de PVA/PNIPAM y una variante de la solución polimérica como película, que servirán como sistemas moduladores.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Funcionalizar la aleación TiNi y el Ti mediante la técnica de anodización para la obtención de nanotubos en su superficie.
- Optimizar el diámetro de poros de los nanotubos de titano respecto al MTX.
- Dopar los nanotubos con el fármaco Metotrexato por medio de la técnica dip coating.
- Sintetizar una membrana polimérica nanofibrosa de PVA /PNIPAM sobre los nanotubos mediante la técnica de electrohilado.
- Sintetizar una membrana polimérica nanofibrosa de PVA/PNIPAM sobre los nanotubos mediante la técnica por evaporación de solventes.

- Estudiar los perfiles de liberación del fármaco encapsulado en los nanotubos de titanio.
- Comparar distintos tipos de arreglos de membranas poliméricas para determinar su efectividad en la modulación en la liberación del MTX encapsulado en los nanotubos de titanio.

1.4 Referencias

- [1] Self-ordered nanopore and nanotube platforms for drug delivery applications. Losic, Dusan and Simovic, Spomenka. 2009, Journal Expert opinion on Drug Delivery, pp. 1363-1381.
- [2] The pathogenesis of Staphylococcus aureus in autoimmune diseases. Mousavi, Mir NaserSeyyed, et al. 2017, Microbial Pathogenesis, pp. 503-507.
- [3] Dextran sulfate nanoparticles as a theranostic nanomedicine for rheumatoid arthritis. Heo, Roun, et al. 2017, Biomaterials, pp. 15-26.
- [4] M. Long, H.J. Rack, Titanium alloys in total joint replacement—a materials science perspective, Biomaterials 19 (1998) 1621–1639.
- [5] I.V.S. Yashwanth, I. Gurrappa, The effect of titanium alloy composition in synthesis of Titania nanotubes, Mater. Lett. 142 (2015) 328–331
- [6] X. Sui, X. Feng, A. Di Luca, C.A. van Blitterswijk, L. Moroni, M.A. Hempenius, G.J. Vancso, Polym. Chem. 4 (2013) 337–342.
- [7] H.S. Lee, S.S. Dastgheyb, N.J. Hickok, D.M. Eckmann, R.J. Composto, Biomacromolecules 16 (2015) 650–659.
- [8] R. Elashnikov, O. Lyutakov, P. Ulbrich, V. Svorcik, Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl. 64 (2016) 229–235.
- [9] M. Zelzer, S.J. Todd, A.R. Hirst, T.O. McDonald, R.V. Ulijn, Biomater. Sci. 1 (2013) 11–39. [9] F.D. Jochum, P. Theato, Chem. Soc. Rev. 42 (2013) 7468–7483.
- [10] K.H. Liu, T.Y. Liu, S.Y. Chen, D.M. Liu, Acta Biomater. 4 (2008) 1038–1045.

- [11] O. Lyutakov, O. Hejna, A. Solovyev, Y. Kalachyova, V. Svorcik, RSC Adv. 4 (2014) 50624–50630.
- [12] N. Yamada, T. Okano, H. Sakai, F. Karikusa, Y. Sawasaki, Y. Sakurai, Makromol. Chem.-Rapid 11 (1990) 571–576.
- [13] Feng XJ, Macak JM, Albu SP, Schmuki P. Electrochemical formation of self-organized anodic nanotube coating on Ti-28Zr-8Nb biomedical alloy surface. Acta Biomater. 2008;4(2):318-323. doi: 10.1016/j.actbio.2007.08.005.
- [14] Bhardwaj N, Kundu SC. Electrospinning : A fascinating fiber fabrication technique. 2010;28:325-347. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.01.004.

2. MARCO TEORICO Y ANTECEDENTES

2.1 Padecimiento artritis reumatoide (AR)

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica compleja caracterizada por el aumento de la permeabilidad vascular y la invasión de células inmunes como macrófagos y linfocitos activados [1]. Aunque la causa precisa de la AR sigue siendo desconocida, se ha descubierto que los macrófagos son las células más prominentes en las articulaciones inflamadas de pacientes con AR y se cree que contribuyen de manera importante a la inflamación de la articulación y daño articular [2,3].

Los grupos de edad a nivel mundial, con mayor proporción de casos fueron los correspondientes a los pacientes entre 50 y 69 años como se muestra en la figura 2.1.

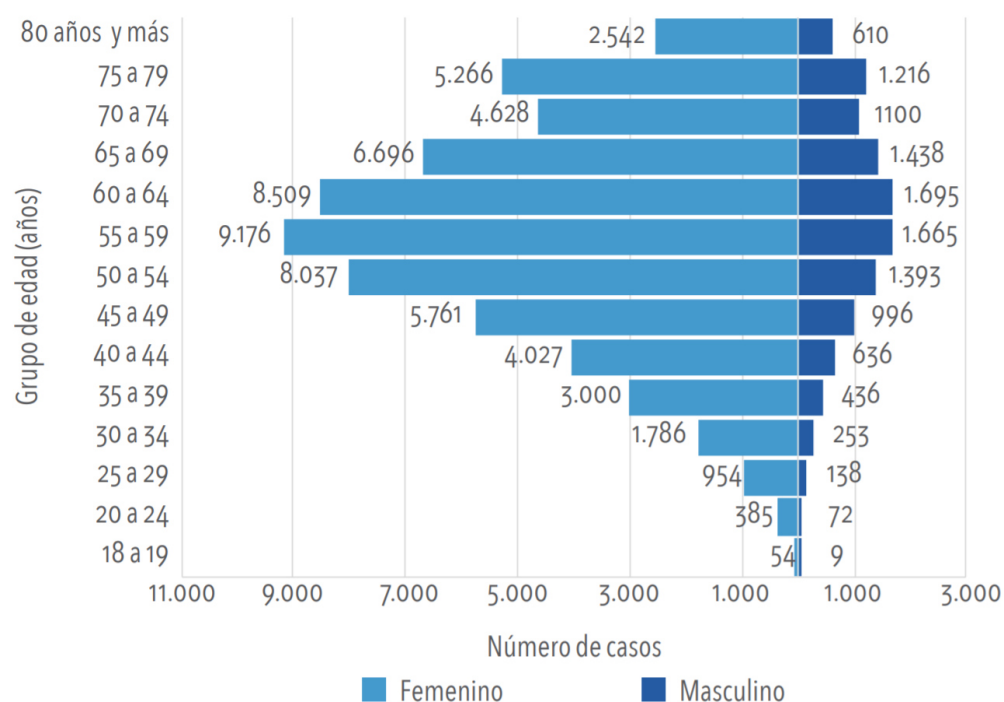


Figura 2.1 Pirámide poblacional de los casos de AR [4].

La población más afectada en Artritis Reumatoide pertenece a niveles socioeconómicos bajos. En 2013, el Congreso del Colegio Mexicano de Reumatología, reportó una prevalencia del 1.6% dentro de la población, lo que colocó a México dentro de los países con alto

porcentaje en artritis reumatoide. Tres de cada cuatro personas con artritis reumatoide son mujeres, esta diferencia entre sexos disminuye a edades más avanzadas. En México, el estado con mayor tendencia es Yucatán. [5]

2.1.1 Fármaco Metotrexato (MTX)

Para tratar el padecimiento de la artritis reumatoide se ha utilizado el metotrexato (MTX) como agente seguro y eficaz desde la década de 1980 [6]. Con la implementación de terapias, se obtuvieron buenos resultados hacia los pacientes tratados colocándose como uno de los fármacos más ampliamente utilizados en la artritis reumatoide, especialmente como un fármaco ancla para la terapia de combinación de agentes biológicos [7 - 9]. Sin embargo, el uso prolongado y suministro de altas cantidades de dosis por sesión provocan riesgos significativos de efectos adversos [10]. Una ventaja médica es la alternativa de poder usar nano-vehículos que transporten el medicamento, en lugar de los convencionales medios, ya que cumplen múltiples tareas en áreas específicas, reduciendo el contenido perdido y suministro de cantidades suficientes a lo largo de la farmacocinética [11]. Los factores que tenemos que tomar en cuenta al momento de realizar un nano-vehículo es la retención de fármacos en la circulación sanguínea contra la liberación en tejidos inflamados y en la sangre de los vasos inflamatorios [12].

2.1.2 Mecanismo de acción del metotrexato.

En el uso de sistemas o terapias de supresión de cáncer intracelular y padecimientos de artritis reumatoide. El MTX tiene un mecanismo de acción excelente. Como se representa en la Figura 2.2 la estructura del metotrexato siendo una variante del ácido fólico (A), una vez que el MTX se encuentra dentro de las células, las moléculas MTX como antagonista del ácido fólico (FA), forman enlaces covalentes con la enzima citosólica dihidrofolato reductasa (DHFR), involucrada en el ciclo del folato. El ciclo del folato junto con la timidina y el ADN, se detiene debido a la desactivación de la reacción enzimática intracelular de dihidrofolato a tetrahidrofolato y como consecuencia de la permeación de MTX en el citosol, dando lugar a la muerte celular (B) [39].

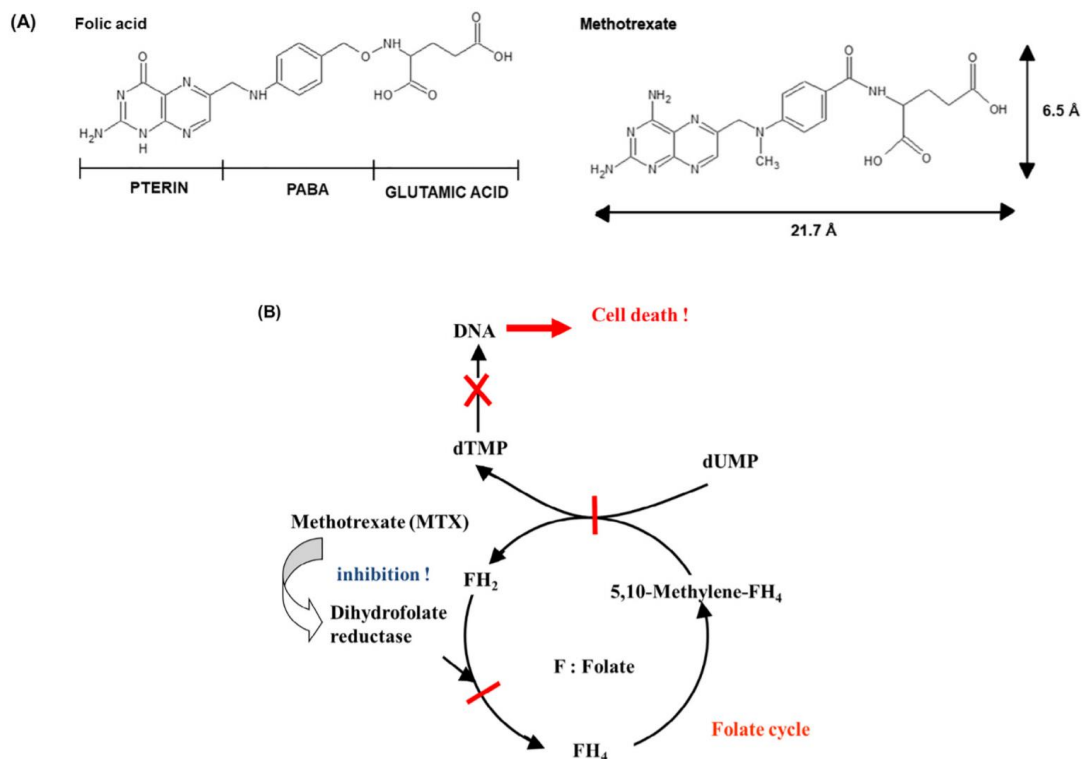


Figura. 2.2 (A) Estructura molecular del ácido fólico y metotrexato. (B) Mecanismo anticancerígeno del metotrexato (MTX) [28].

2.1.3 Desventajas del metotrexato

A pesar del excelente mecanismo de acción en la supresión de células cancerígenas y artritis reumatoide, la utilidad del metotrexato en la quimioterapia contra el cáncer ha sido restringido debido a efectos adversos inesperados debido a su alta toxicidad [13]. Las investigaciones reportan que en pacientes que presentan artritis reumatoides, en quienes se administró MTX por administración intravenosa a intervalos semanales con una dosis inicial de 10 mg y dosis máxima de 50 mg para pacientes tolerantes, alrededor de 60 a 85% de los pacientes con dosis altas de MTX han presentado reacciones adversas a los medicamentos y el 10-30% no pudo continuar debido a la toxicidad expuesta [13]. En otros estudios, del 10 al 50% presentaron efectos secundarios tales como: náuseas, dolores de cabeza y vómitos dentro de las 8 hr después de la administración, que continuaron presentes durante unas pocas horas y hasta una semana [14].

En estudios a largo plazo se presentaron anomalías más frecuentes como la leucopenia y la trombocitopenia. Por parte de los efectos secundarios de MTX en el sistema nervioso central se presentaron: mareos, dolor de cabeza, aturdimiento, vértigo y alteraciones del estado de ánimo [15, 16]. Referente a la toxicidad hepática en pacientes tratados con MTX diariamente, se reportó que la fibrosis hepática, la cirrosis y la psoriasis se presentó en el 24% de los pacientes después de aumentar el acumulado. En el caso de dosis bajas semanales a largo plazo, MTX no está asociado con problemas significativos para los pacientes con AR, sin embargo, la excreción tardía de MTX y sus metabolitos podría resultar en toxicidad para los riñones y el sistema reproductivo. Otro punto importante es la utilización del MTX en pacientes embarazadas, ya que se han observado múltiples anomalías congénitas después de los tratamientos semanales de MTX a 10 mg por dosis durante los primeros 3 meses de embarazo, también se reportaron algunas malformaciones debidas al uso del MTX [17,18]. Debido a todos los padecimientos y complicaciones causados por el fármaco muchos científicos han tratado de diseñar un vehículo viable para la administración de MTX y así para superar estas limitaciones.

2.1.4 Nanovehículos usados para liberación de metotrexato.

Con la nanotecnología se han diseñado los fármacos inteligentes que tienen como principal mecanismo la liberación controlada de un medicamento en una región específica del organismo. Este tipo de fármacos están formados por una cubierta sintética que contiene el principio activo del tamaño nanométrico que lo dirige al lugar adecuado. Así aumenta su eficacia y se evitan los efectos secundarios en otras partes del cuerpo. Sin embargo, este ‘nanovehículo’ debe cumplir varios requisitos, como ser resistente en los medios biológicos, tener una vida media relativamente elevada y, evidentemente, no ser tóxico.

Los nano-vehículos pueden diferenciarse en dos grupos:

- Nano-vehículos orgánicos.
- Nano-vehículos inorgánicos.

En la tabla 1 se puede observar los experimentos que se han usado con distintos nanovehículos orgánicos en la liberación de metotrexato, a su vez, su composición, método a utilizar y su porcentaje eficiencia de carga y de liberación.

Tabla 1. Resumen de nano-vehículos orgánicos para la administración de metotrexato [19].

Nanocarrier	Materiales	Metodo sintetico	Eficiencia de encapsulado	Capacidad de carga	Liberacion de MTX
Liposoma	y-Fe2O3-ácido glutámico y colesterol	Método de evaporación en fase inversa	61%	--	90% (41 C, pH 5.5, 60 min)
	DSPE-PEG2000, DPPG, DSPC y PEG4000	Método de acoplamiento de microburbujas	83.4%	31.4%	--
	Ara-C and DPPC	Método de evaporación en fase inversa	86%	--	21% (4 C, pH 7.6, 28 d)
	PEG-P(HPMA-LA)-PDMA	Método de autocrosslinking	65.1%	30%	20% (37 C, pH 7.4, 24 h)
Nanopartículas poliméricas	Prot A7	Método de auto-ensamblaje	52%	9.8%	100% (37 C, pH 7, 80 min)
	Albúmina sérica humana funcionalizada con LHRH	Entrecruzado por EDC	--	--	99% (4 C, pH 7.4, 28 d)
	Quitosano conjugado con ácido fólico	Enlace corónico iónico con TPP	--	11.5%	84% (37 C, pH 6.8, 120 h)
	Quitosano conjugado con ácido fólico	Enlace corónico iónico con TPP	89.6%	4.5%	65% (37 C, pH 7.4, 72 h)
	PEGylated chitosan	Inducida por iones combinada con reticulación química	87.7%	44.2%	5.5% (37 C, pH 7.4, 144 h)
	PAMAM conjugado de quitosano	Método de acoplamiento EDC	--	--	35% (37 C, pH 7.4, 24 h)
	Quitosano	Método de secado por pulverización	90.1%	--	75% (37 C, pH 7.4, 3 h)
	PLGA conjugado con albúmina de suero bovino cargada positivamente	Método de difusión de disolventes.	71.3%	--	20% (37 C, pH 7.4, 8 h)
Nanopartícula lipídica sólida Micela polimérica	Ácido esteárico, lecitina de soja y taurodeoxicolato de sodio	Polimerización en emulsión	40.9%	--	47.3% (37 C, pH 7.4, 5 h)
	Silicio poroso hidrocarbonizado.	Método de enfoque de flujo microfluídico	12.5%	--	50% (37 C, pH 7.4, 50 min)
	Imwitor, Neobee Cremophor RH40 y Pluronic F127	Método de homogeneización de alto cizallamiento.	70.3%	--	75% (37 C, pH 7.4, 12 h)
	Palmitato de cetilo, Miglyol 812 y polisorbato 80	Método de ultrasonidos	83%	--	56.9% (37 C, pH 7.4, 24 h)
	Ácido esteárico, Tween-80, lecitina de soja y Triton X-100	Método de difusión de disolventes.	22.3%	7.02%	55% (37 C, pH 7.4, 48 h)
	Fucose, Pluronic F-68, Triton X-100 y Gelucire 50/13	Método de microemulsión caliente.	84%	15.2%	85% (37 C, pH 7.4, 96 h)
	mPEG-PLA	Polimerización a 150°C durante 16 h.	47.3%	12.8%	10% (37 C, pH 7.4, 5 d)
	PEG-PLA	Método de hidratación de película delgada.	96.7%	9.6%	33% (37 C, pH 7.4, 72 h)
	PEG-PCL	Proceso de polimerización bajo apertura de anillo.	--	2.8%	80% (37 C, pH 7.4, 6 h)
	PLGA y lecitina de soja.	Emulsion	76.9%	30.6%	67.2% (37 C, pH 7.4, 24 h)
	PEG-CHO	Emulsion	32%	--	33% (37 C, pH 7.4, 72 h)
Dendrímico	PAMAM y OEG	Método de diálisis	85.2%	--	40% (37 C, pH 7.4, 2 h)
	PEPE conjugado con glucosamina	Síntesis convergente y divergente.	66%	20%	--

En la tabla 2 se puede observar los experimentos que se han usado con distintos nano-vehículos inorgánicos en la liberación de metotrexato, a su vez, su composición, método a utilizar y su porcentaje de eficiencia de carga y de liberación.

Tabla 2. Resumen de nano-vehículos inorgánicos para la administración de metotrexato [19].

Nanocarrier	Materiales	Metodo sintetico	Eficiencia de encapsulado	Capacidad de carga	Liberacion de MTX
Nanopartículas metálicas	Nanopartícula de oro	Nanopartícula de oro	--	25%	70% (37 C, pH 7.4, 11 h)
	Alginato, curcumina y nanopartículas de oro.	Activación térmica	--	1.3%	--
	PEG y nanopartículas de oro.	Formación y estabilización in situ.	36.9%	11.53%	40% (37 C, pH 7.4, 48 h)
	PEG y nanopartículas de plata.	Método de reducción química	39.6%	--	--
Nanopartícula de óxido de metal	PEG y óxido de hierro.	Reacción sol-gel	--	1.96%	--
	Cy5.5, PEG, Quitosano y óxido de hierro	Coprecipitación química	--	6.2%	10% (37 C, pH 7.4, 24 h)
Nanopartícula de sal metálica	Fosfato de calcio	Reacción sol-gel	--	6%	71.9% (37 C, pH 7.4, 24 h)
	Carbonato de calcio	Método de difusión de gas	--	30.6%	60% (37 C, pH 7.4, 60 h)
Nanomaterial de carbono	Nanopartículas de carbono y albúmina de suero bovino.	Hollín de mecha de algodón	--	64%	79% (37 C, pH 7.4, 48 h)
	Punto de carbono, digitonina	Inyección de precursor de carbono a solventes no coordinantes calientes.	94%	--	20% (37 C, pH 7.4, 6 h)
	AF488 / 647, CNT con paredes múltiples recubiertas de FA y 99Tc	Enlace éster hidrolizable (MTX)	86.4%	33.8%	10% (37 C, pH 7.4, 48 h)
	Gelatina, óxido de grafeno	Método de hummer	--	28.1%	40% (37 C, pH 7.4, 12 h)
	Óxido de grafeno	Método de hummer	--	120%	25% (37 C, pH 7.4, 48 h)
	Dopamina, óxido de grafeno	Método de hummer	81.8%	19.2%	80% (37 C, pH 7.4, 24 h)
	Óxido de hierro y óxido de grafeno	Método de hummer	89.6%	--	49% (37 C, pH 7.4, 40 h)
Nanopartícula porosa	MCM-41	Reacción hidrotermal	--	13%	42% (37 C, pH 6.8, 2 h)
	MOF a base de porfirina	Reacción solvotérmica	--	-40%	40% (37 C, pH 2.0, 72 h)
	MOF a base de zinc	Reacción solvotérmica	--	13.4%	54.5% (37 C, pH 7.4, 72 h)

En la figura 2.3 Se presenta el esquema de los vehículos utilizados ya sea de orgánicos o inorgánicos que se han usado a lo largo del tiempo con el MTX a nivel nanométrico.

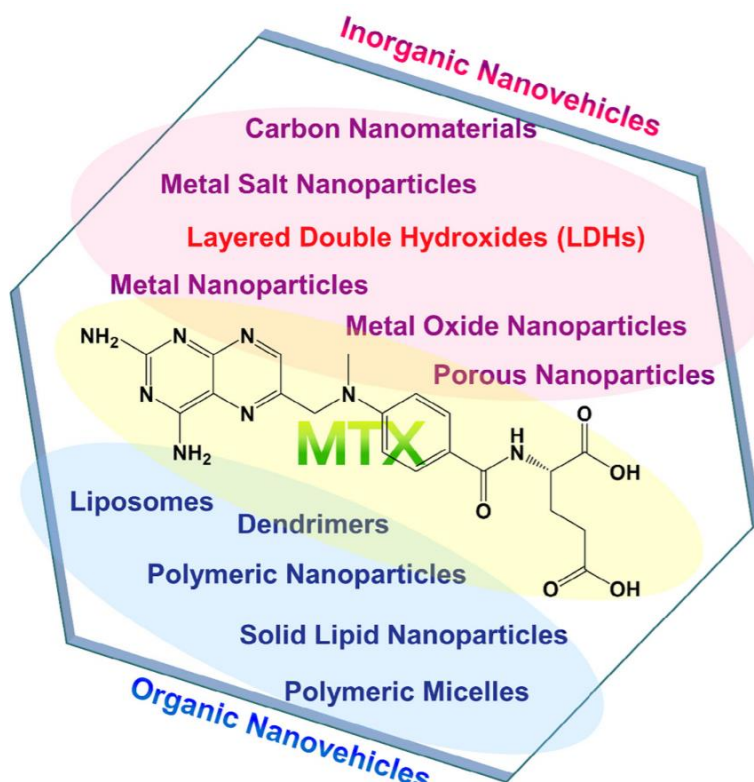


Figura. 2.3. Diagrama esquemático de nano-vehículos de entrega de metotrexato clasificados en materiales inorgánicos y orgánicos [19].

Tener dos nanoestructuras en fases contiguas contrae una gran variedad de ventajas, ya que las nanofibras poliméricas son conocidas por mimetizar la matriz extracelular y esto permite que los sistemas de nanotubos como portadores de sustancias terapéuticas puedan tener una mayor viabilidad “in vivo” al disminuir los riesgos que se pueden presentar al entraren contacto con el sistema inmunológico del cuerpo. La membrana de nanofibras también funcionará como una barrera difusiva para optimizar los tiempos de liberación.

Nuestro equipo de trabajo ha realizado ensayos de combinación de estos dos tipos de nanoestructuras, generando nanofibras con muchos defectos y poca cantidad de fibras, a su vez en la literatura no se ha encontrado un sistema de liberación que haga uso de estos dos tipos de nanoestructuras para una mejor modulación de la liberación del fármaco encapsulado en los nanotubos de titanio. En este trabajo se presenta la optimización de la unión de dos nanoestructuras, tanto en la cantidad de nanofibras como en su morfología con baja cantidad

de defectos y un control del diámetro. Uno de los puntos más importantes de esta investigación es el abordar el uso de las dos nanoestructuras en un sistema de liberación controlado y constante como se explicará más adelante, a su vez, se obtuvo tiempos más prolongados en liberaciones de medicamento.

2.2 Parte inorgánica del sistema de liberación

2.2.1 Aleaciones de titanio

En esta sección hablaremos del componente metálico que conforma nuestro sistema de liberación. Al momento de utilizar un tipo de metal en el campo de la medicina o biología se debe tomar en cuenta una serie de propiedades, para tener un buen material o sistema, que sea útil en la realización de su tarea, ya que dicho sistema podría convertirse en una complicación más, en un padecimiento o enfermedad a atacar, las propiedades son:

- Resistencia a la corrosión
- Biocompatibilidad
- Bioactividad
- Bioadhesión (osteointegración)
- Propiedades mecánicas favorables: Módulo de Young, similar al del hueso y resistencia a la fatiga según la aplicación prevista
- Disponibilidad (precios bajos)

Debido a estos requisitos, el número de materiales metálicos que pueden considerarse es limitado. Hasta ahora, los siguientes grupos de materiales metálicos se han utilizado como biomateriales:

- a) Acero inoxidable, X2CrNiMo1816(316L)
- b) Aleaciones a base de CoCr, CoCr30Mo6, CoNi35Cr20
- c) Titanio y aleaciones de titanio, Ni-Ti
- d) Niobio
- e) Tantalio

2.2.1.1 Resistencia a la corrosión

En condiciones normales en el fluido del cuerpo humano, es decir, una solución de aproximadamente 0,9% de NaCl, el valor del pH asciende a aproximadamente 7,4. Los cambios en el valor del pH pueden ser causados por la cirugía, lo que resulta en un aumento a 7.8 y seguido por una caída a 5.5. Después de unos días se restablece el valor normal de 7.4. En este medio, los materiales más resistentes a la corrosión son el titanio y sus aleaciones, niobio y tántalo, seguidos por el vitalio forjado y fundido, y el acero inoxidable [20].

Ti y sus aleaciones, así como Nb y Ta, pertenecen a ese grupo de metales que, en el fluido corporal, no pueden sufrir una ruptura de la pasividad. Sin embargo, en todos los materiales, la capa pasiva puede dañarse mecánicamente, por ejemplo, por el desgaste del metal contra el metal (sistema de placa / tornillo) o por los instrumentos utilizados durante la cirugía. [21] Por lo tanto, el tiempo de repasivación de la capa de óxido pasivo para estos materiales es muy importante. El comportamiento de repasivación de los diversos materiales en solución salina se midió mediante un método descrito en la literatura [21]. Otra posibilidad para endurecer la superficie de Ti y sus aleaciones sin disminuir la resistencia a la corrosión y las propiedades de fatiga es la captación de oxígeno por oxidación anódica o térmica, combinada con un aumento del contenido de oxígeno en la región superficial del material.

2.2.1.2 Biocompatibilidad

En el sistema implante / cuerpo, varias interacciones y reacciones pueden conducir a las siguientes lesiones:

- a) Mediante el proceso de corrosión se produce un flujo de electrones en el metal del implante y un flujo de iones en el tejido circundante. Este flujo de iones en el tejido puede perturbar el movimiento iónico fisiológico de las células.
- b) Una reacción inorgánica del implante, o especialmente de productos de corrosión primaria, con una gran superficie por solución de iones metálicos en el fluido corporal y transporte a varios órganos, donde se concentran y pueden producir efectos sistémicos o hipersensibles, si se excede el límite de toxicidad para cierto metal.

c) Una reacción orgánica y directa del implante o de los productos de corrosión primaria con proteínas del tejido que causan alergia o inflamación.

d) Producción de H_2O_2 por células inflamatorias y descomposición de H_2O_2 con la formación de un radical hidroxilo que causa una lesión del sistema biológico.

Cualquiera de estas interacciones ocurra o no depende de las propiedades físicas, químicas y termodinámicas de la aleación en cuestión. Se reporta en la literatura que Ti, Ta y Nb son biocompatibles porque forman capas superficiales protectoras de óxidos semi o no conductores. Debido a su efecto aislante, estos óxidos pueden evitar en gran medida el flujo de iones. Este efecto aislante se demuestra por las constantes dieléctricas de los diversos óxidos metálicos. Hay tres grupos de óxidos. Mientras que el TiO_2 (rutilo), Fe_2O_3 y Nb_2O_5 tienen constantes incluso más altas que las del agua, el Al_2O_3 , Cr_2O_3 y Ta_2O_5 tienen un menor efecto de aislamiento y, por lo tanto, una mayor conductividad. Para los óxidos de Ni y V, las constantes dieléctricas no están disponibles debido a su alta conductividad, por lo que se pueden esperar interacciones con el tejido circundante. Debido al efecto aislante de una capa de óxido con una constante dieléctrica similar a la del agua, los implantes de Ti no son reconocidos por el hueso o el tejido como cuerpos extraños [22].

2.2.1.3 Bioadhesión (Osteointegración)

La integración de los implantes metálicos por crecimiento óseo se estudió para una gama de diferentes materiales y sistemas de implantes. El comportamiento de crecimiento interno de las miniplacas hechas de Ti, de Ti-5Al-2.5Fe y de acero inoxidable (316L) se investigó mediante la implantación de estas placas en las patas de los minipigs. Las miniplacas se fijaron a las patas de estos animales mediante tornillos. Después de la extracción después de un tiempo de exposición de 8 semanas, se realizó un examen histológico por microscopía de fluorescencia. Con todos los animales donde se habían utilizado placas de Ti, se pudo observar una nueva formación de hueso en contacto cercano con la superficie de los tornillos y las placas. En contraste con estos resultados, la formación de hueso nuevo en la vecindad de las placas de acero inoxidable fue menor y, además, se encontró tejido granulado entre la superficie metálica y el hueso circundante [23]. Este tejido granulado en la interfaz hueso / implante tiene la desventaja de no ser suministrado con sangre. Por lo tanto, el tejido conectivo granulado no puede transferir o sostener cargas elevadas, por lo que se producirá

un aflojamiento del implante. Este comportamiento se verificó cuando se retiraron los tornillos. Mientras que el momento de separación para los tornillos de titanio permaneció constante con el tiempo de exposición, el momento de separación fue mucho menor para los tornillos de acero inoxidable y, además, se observó un máximo después de un tiempo de exposición de 6 semanas.

De todos los tipos de implantes posibles, los implantes dentales deben cumplir los requisitos más críticos porque están en contacto con tres tipos diferentes de tejido. Además de un accesorio al hueso alveolar (tejido duro) y al ligamento periodontal (tejido conectivo) para el mantenimiento del hueso, el problema principal es un accesorio a la encía (epitelio) para sellar. El sellado de esa parte del implante que ingresa a la cavidad oral tiene que prevenir las reacciones inflamatorias causadas por bacterias. Debido a su buen comportamiento de crecimiento interno, los implantes de Ti no muestran tendencia a una disminución del epitelio. El cultivo de células con partículas de polvo de Ti mostró adhesión de la encía. Después de solo 24 horas, las células se adhirieron al polvo y formaron puentes citoplasmáticos [24].

2.2.1.4 Memoria de forma

Las aleaciones con memoria de forma son una clase única de material con la capacidad de "recordar" su forma después de deformarse plásticamente. Las aleaciones con memoria de forma vuelven a su forma original mediante el calentamiento o algún otro estímulo externo, siempre que la deformación que experimentan esté dentro de un rango recuperable.

La aleación de memoria de forma más efectiva y común es el níquel-titanio, donde el contenido de titanio es de 45 a 50%. Las aleaciones de níquel-titanio que están disponibles comercialmente se comercializan con el nombre de marca 'Nitinol'. Varias aleaciones que no son de titanio también tienen propiedades de memoria de forma, especialmente las aleaciones de cobre-zinc-aluminio y cobre-aluminio-níquel, pero su rendimiento de memoria de forma y propiedades mecánicas no son tan buenas como el níquel-titanio.

El efecto de memoria de forma es posible porque ocurre un cambio de fase o, en otras palabras, un cambio en la estructura cristalina en el material con la aplicación de tensión y calor.

Existe una aleación de memoria de forma en la condición no deformada (original) como martensita hermanada. La microestructura de la martensita gemela consiste en granos separados por límites gemelos. Estos límites se pueden considerar como planos de simetría con una imagen especular de enlace idéntico y configuración atómica en ambas direcciones. Cuando la martensita hermanada se deforma bajo una carga aplicada externamente, los límites gemelos se mueven para producir martensita deformada. Este cambio se denomina transformación de desplazamiento, que implica la reorganización cooperativa de los átomos en una estructura cristalina diferente y más estable sin un cambio correspondiente en el volumen. El efecto de memoria de forma se produce porque la martensita deformada se convierte de nuevo en martensita hermanada calentando la aleación de níquel-titanio a una temperatura moderada. El calor proporciona la energía necesaria para transformar la martensita deformada en austenita, que tiene una estructura de cristal cúbico, que luego se transforma en martensita hermanada al enfriarse. Cuando la martensita deformada se convierte nuevamente en martensita hermanada a través de la fase austenita, la aleación recupera su forma original. Este proceso de cambio de forma bajo carga aplicada y luego recuperación de forma por calentamiento puede repetirse muchas veces. La temperatura a la que deben calentarse las aleaciones con memoria de forma para inducir el efecto de memoria de forma está determinada por su composición química, y para las aleaciones de níquel-titanio está dentro del rango de -100 y $+100$ ° C. Vale la pena señalar que existe un límite de deformación en el cual las aleaciones con memoria de forma pueden deformarse. La recuperación completa de la forma no se puede lograr cuando el material se deforma por encima de este límite. El límite de tensión para las aleaciones de níquel-titanio es de aproximadamente el 8,5% [25].

2.2.2 Nanotubos

El titanio (Ti) y sus aleaciones se han utilizado ampliamente en el campo biomédico, principalmente en articulaciones artificiales y ortopedia e implantes dentales, debido a su bajo módulo elástico y excelente resistencia a la corrosión [26,27]. Sin embargo, el uso de las aleaciones de titanio como implantes o prótesis no solo necesitan de un módulo de elasticidad bajo, sino también una buena osteointegración en una interfaz hueso-implante. La osteointegración se puede mejorar modificando la superficie del implante, por ejemplo, mediante el crecimiento controlado de una capa de nanotubos de TiO_2 auto-organizada

mediante anodización electroquímica [31]. En los últimos años, el titanio metálico que contiene capas de nanotubos de TiO_2 auto organizados ha atraído cada vez más la atención de los científicos en su uso de implantes debido a la combinación única de propiedades de óxido de titanio, como la no toxicidad y alta estabilidad en condiciones de pH. Los nanotubos de TiO_2 anodizados son generalmente amorfos y dependiendo del tratamiento térmico que se aplique pueden mostrar dos estructuras polimórficas: anatasa y rutilo, teniendo diferencias físicas [32].

Los nanotubos de TiO_2 muestran módulos elásticos inferiores en comparación con su sustrato de las aleaciones utilizadas, tomando en cuenta lo anterior se realizaron investigaciones donde mencionan su uso como implantes in vivo y a someterlos a pruebas para su evaluación de degradación mecánica, dando como resultados que la morfología de los nanotubos no muestra cambios, lo que indica su resistencia al daño al uso como implantes [28,29]. Otra ventaja de los nanotubos de TiO_2 es su relación área superficie y su similitud dimensional, además, que estimulan al crecimiento de las células de osteoblastos, mejorando la osteointegración [33]. Lo que con lleva a su implementación en aplicaciones biomédicas ya que mejora la proliferación y adhesión celular [30].

2.2.2.1 Funcionalización superficial mediante la técnica de anodizado

La anodización es un proceso electroquímico empleado en los últimos años para producir estructuras controladas a nanoescala. La modificación de la superficie es llevada a cabo en una celda electroquímica, en la cual se aplica una diferencia de potencial entre electrodos [34]. Los materiales a oxidar actúan como electrodos positivo o ánodo, mientras que como electrodo negativo o cátodo se emplean materiales químicamente inertes en el baño de anodizado como el platino [35]. Ambos electrodos se conectan a un circuito eléctrico externo para establecer una diferencia de voltaje entre ellos. El uso del material del cátodo influye en la velocidad del crecimiento de las capas anódicas afectando directamente en la sobretensión producida entre el cátodo y el ánodo, lo que puede originar cambios en la morfología y espesor de la capa de óxido [36]. En el caso del titanio y sus aleaciones, se ha reportado que el crecimiento de capas se genera mediante el empleo de electrolitos acuosos que contengan iones fluoruros o cloruros, debido a la solubilidad del óxido de titanio, en presencia de estas soluciones, lo que afecta directamente a las características morfológicas de los nanotubos generados [37, 38].

Como ya se mencionó, las capas de nanotubos de TiO_2 se forman por una reacción de oxidación electroquímica que, dependiendo del electrolito a utilizar, como el voltaje aplicado, el material a anodizar y el tiempo de anodizado se representan a continuación en los siguientes pasos el proceso electroquímico. Ver figura 2.4.

1. La capa de óxido de Titanio es producida por la reacción de oxidación en el ánodo dando como resultado iones Ti^{4+} y una desprotonación de hidroxilos
2. En este caso los iones de F presentes en la concentración del electrolito reaccionan con TiO_2 formando fracturas
3. Se forman poros en la superficie de TiO_2
4. Empieza la formación de los Nanotubos de TiO_2 .

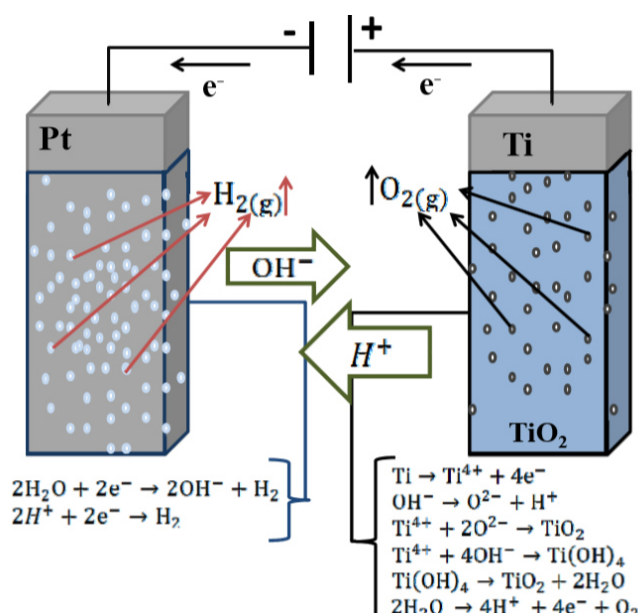


Figura 2.4 Esquema simplificado de las reacciones que ocurren durante el proceso de anodizado [39-41].

2.2.3 Liberación de fármaco a partir de aleaciones anodizadas con superficies nanoestructuradas

Los nanotubos obtenidos mediante el proceso de anodización en aleaciones de titanio, han sido reportados como uno de los sistemas de liberación de fármacos más prometedores en implantes biomédicos y son considerados como una de las principales alternativas para superar a los sistemas convencionales de administración de fármacos [42-44].

Las terapias convencionales basadas en la administración sistémica de fármacos presentan limitaciones y efectos secundarios asociados, mientras que la administración localizada de fármaco basada en estructuras nanotubulares podría ofrecer ventajas potenciales para tratar infecciones relacionadas con implantes óseos. Mediante estudios *in vitro*, se ha demostrado la capacidad que tienen los nanotubos de titanio para cargar y liberar fármacos insolubles en agua usando alambres e implantes de forma plana. [45, 46]

Teniendo en cuenta que, cada vez más estudios se centran en explorar diferentes estrategias en los implantes de liberación de fármacos basados en TNT para diseñar y avanzar en sus rendimientos de liberación de fármacos para drogas y terapias específicas. Se describen a continuación unos ejemplos.

2.2.3.1 Liberación de fármacos sensibles a pH y temperatura

Se ha demostrado que los TNT (nanotubos de titanio por sus siglas en inglés) son una plataforma prometedora para la entrega local de fármacos, sin embargo, la liberación de fármacos a partir de TNT puros presenta una liberación rápida. Por lo tanto, se aplicaron polímeros sensibles al pH para superar el problema de la liberación demasiado rápida del fármaco de los TNT, la literatura reporta que el poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) agregado a los TNT podría mejorar el perfil de liberación del fármaco [47]. En su estudio, el carprofeno y la lidocaína se usaron como fármacos modelo para investigar el perfil de liberación del fármaco utilizando PLGA / TNT con diferentes tipos de fármacos. Para investigar la liberación de PLGA / TNT en diferentes condiciones de pH, se estudiaron las liberaciones de lidocaína y carprofeno en tampón de acetato de sodio con pH 3.5, solución salina solución amortiguadora con fosfato con pH 7.4 y tampón de fosfato con pH 10.5, respectivamente, bajo la temperatura constante de 37°C.

Para la administración de fármacos sensibles a la temperatura basados en TNT, se han explorado polímeros sensibles a la temperatura para decorar los implantes TNT. En la literatura sobre el tema, se ha informado de un sistema de administración de fármacos sensible a la temperatura basado en TNT mediante el uso de vitamina B₂ como fármaco modelo, en este sistema se exploró la cinética de la liberación controlada de fármacos desde TNT con disparador sensible a la temperatura. [48]. En su estudio, la capa de hidrogel formada a partir de poli (N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm) y poli (acrilamida) (PAAm) se

utilizó como una película que revistió la superficie de las capas de TNT para sellar los nanotubos abiertos. El hidrogel compuesto PNIPAAm / PAAm presenta un estado altamente hinchado en agua que impide la liberación del fármaco de los TNT cuando la temperatura circundante está por debajo de su temperatura de solución crítica más baja, mientras que el hidrogel compuesto está en un estado de colapso para permitir la liberación del fármaco de los TNT una vez que la temperatura es más alta que la temperatura de solución crítica más baja del hidrogel compuesto.

2.2.3.2 Liberación de fármacos sensibles a la luz

Para un estudio en profundidad de la liberación controlada de medicamentos o terapias con TNT, la liberación sensible a la luz también es una estrategia prometedora, la literatura nos reporta que los TNT se usaron para proporcionar un sistema de liberación de fármaco altamente controlable basado en una capa hidrófoba (monocapa de OPDA) en la parte superior de los TNT, que puede eliminarse mediante la escisión de la cadena inducida por ultravioleta (UV). En este trabajo, se utilizaron diferentes enfoques de carga de drogas para estudiar la liberación de drogas hidrofílicas de los TNT anfífilos. A partir de estos resultados, se demostró que la luz ultravioleta podía hacer la escisión de la cadena y luego inducir la liberación del fármaco de los TNT, abriendo así perspectivas potenciales para los sistemas de suministro de fármacos basados en el control de la luz. Además, la liberación del fármaco inducida por la escisión en cadena de los TNT también puede activarse mediante la irradiación con láser de infrarrojos (IR) adecuada [49].

2.2.3.3 Liberación de fármacos sensibles a la radiofrecuencia

La liberación sensible a la radiofrecuencia (RF) es una estrategia excelente para satisfacer algunas terapias que requieren el uso de estímulos externos no invasivos. Este concepto se ha introducido en la liberación del fármaco basado en implantes TNT [50]. En este sistema de administración de fármacos, la RF se utilizó como estímulo externo para desencadenar la liberación de micelas poliméricas y fármacos a partir de nanopartículas de oro depositadas por TNT (AuNP). En comparación con los perfiles de liberación en condiciones de no activación, las micelas poliméricas mostraron una liberación in vitro abrupta bajo activación de RF. Durante el proceso de liberación del fármaco inducido por RF, el poder de RF no cambió ni dañó la estructura de la micela ni los implantes TNT. Por lo tanto, la

administración de fármacos sensibles a RF posee un potencial significativo para extirpar células cancerosas en la ubicación del implante.

2.2.3.4 Liberación de fármacos sensibles a campos magnéticos

La administración de fármacos sensibles a los efectos magnéticos es un nuevo concepto de fármaco encapsulado en estructuras nanomagnéticas que posee excelentes posibilidades para la liberación de fármacos activada por campos magnéticos. La literatura reporta diseños de implantes liberadores de fármacos asistidos por un campo magnético externo basado en nanopartículas magnéticas (MNP) cargadas dentro de TNT [51]. Aunque esta estrategia también presenta algunas limitaciones, como la liberación incontrolada desencadenada por los campos magnéticos existentes en el medio ambiente, sigue siendo particularmente valiosa para los implantes liberadores de fármacos en ortopedia y cirugía ósea, donde la liberación a pedido es necesaria en situaciones de emergencia.

2.2.3.5 Liberación de fármacos sensibles al ultrasonido

Se espera que el suministro de medicamentos sensibles al ultrasonido basado en la aplicación del campo ultrasónico local sea un método más confiable en comparación con el suministro de medicamentos sensibles al magnetismo que es incontrolable en la liberación del medicamento cuando se activa por campos magnéticos. La literatura nos presenta la aplicación de un campo externo ultrasónico local para desencadenar la liberación de fármacos de TNT [52]. En este estudio, se utilizaron ondas ultrasónicas como desencadenante del sistema local de administración de fármacos que responde al estímulo combinando implantes TNT. Con respecto a la aplicación de este concepto, puede aplicarse para terapias óseas, administración local de medicamentos y sistemas implantables de administración de medicamentos, incluidos los stents y la administración de medicamentos cerebrales.

Estos estudios demostraron que la liberación del fármaco de los implantes TNT puede ser activada remotamente por estímulos externos, por lo que se espera que se aplique en algunas terapias médicas como la terapia ósea, la quimioterapia local, la quimioterapia sistémica, etc.

Sin embargo, el desarrollo de estos conceptos aún se encuentra en una etapa preliminar, y se requieren más estudios *in vitro* e *in vivo* para confirmar su viabilidad para aplicaciones prácticas en el cuerpo vivo.

2.3 Parte orgánica del sistema de liberación

2.3.1 Poli (nisopropilacrilamida) PNIPAM

El área de materiales inteligentes en el campo de liberación de fármacos se ha enfocado a la creación de materiales antibacterianos basados en los llamados polímeros sensibles al estímulo. En general, los polímeros inteligentes o sensibles al estímulo pueden someterse a cambios físico-químicos en respuesta a diversos estímulos externos como: temperatura, luz, pH, aparición de enzimas o iones, desencadenado por campos magnéticos o eléctricos. [53]

Uno de los polímeros inteligentes con mayor capacidad de respuesta es la poli (nisopropilacrilamida) (PNIPAM), debido a su propiedad de baja temperatura crítica de la solución (LCST) de 32°C. Por debajo de LCST el PNIPAM es soluble en agua, pero por encima de la LCST, existe dominación de los enlaces de hidrógeno intramolecular y el polímero se vuelve insoluble. Esta propiedad hace del PNIPAM un material atractivo para la liberación de fármacos con temperatura controlada [53].

En la última década el PNIPAM se utiliza activamente con la técnica de electrohilado, generando nanofibras, estas estructuras tienen una enorme relación superficie-volumen que las convierte en un material atractivo como portador de micro y nano-agentes [54]. El PNIPAM combinado con otros polímeros tiene la ventaja de poder ajustar la temperatura de la transición de fase del polímero [55-57], como se mencionó antes, el LCST del PNIPAM se puede ajustar de dos formas: al momento de la síntesis de la polimerización de Monómero NIPAM o mediante mezclas con otros polímeros [58,59]. En investigaciones reportadas, los polímeros utilizados en la mezcla de polímeros son el: poli (alcohol vinílico) (PVA), poli (ácido acrílico) (PAA) y nanogel PNIPAM. Estas "nano-resinas" no muestran una reducción global/hinchazón, pero demuestran liberación termo-sensible [60].

2.3.2 Técnica generadora de nanofibras (Electrohilado)

Las características básicas de la técnica del electrohilado se basan en un electrodo que es insertado en la solución polimérica y el otro electrodo al colector, el cual a su vez es conectado a tierra [61]. Cuando un alto voltaje es aplicado, la repulsión de cargas en la superficie del fluido provoca una fuerza directamente opuesta a la tensión superficial del

fluido. Cuando el campo eléctrico es incrementado, la superficie semiesférica del fluido en la punta de la aguja del inyector se e longa hasta llegar a la forma cónica llamado “cono de Taylor”. Un chorro de fluido cargado es expulsado desde la punta del cono de Taylor, cuando la fuerza electrostática vence la tensión superficial en un valor crítico del campo eléctrico. Una característica observada durante este proceso es la salida aleatoria del chorro polimérico conocida como “whipping”, como se observa en la figura 2.5.

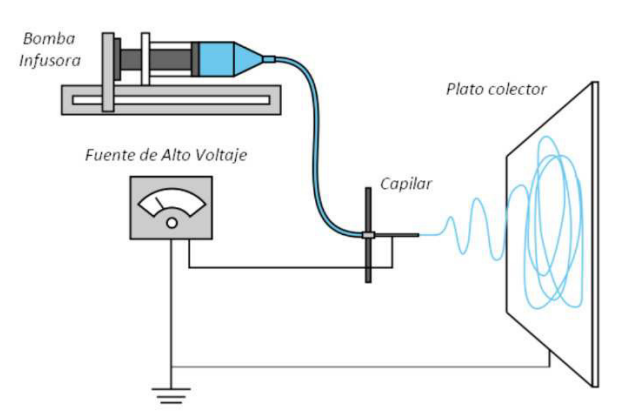


Figura 2.5 Representación gráfica de la técnica de electrohilado [62].

La evaporación del solvente toma lugar desde las fibras poliméricas cargadas hasta llegar al colector produciendo una esterilla de fibras no tejidas. Las principales ventajas de las nanofibras en comparación con las películas de polímeros son la alta relación área a volumen y la buena interacción de este tipo de nanoestructuras en presencia de biomoléculas debido a su parecido con la matriz extracelular [62].

2.3.3 Membranas nanofibrosas

Las nanofibras pueden jugar un rol muy importante en el control de la liberación de fármaco. Las nanofibras son fibras con diámetros en el rango nanométrico (50-500nm) que pueden obtenerse a partir de diferentes soluciones de polímeros mediante diferentes procesos de síntesis. Las nanofibras poliméricas han sido muy utilizadas en biomedicina como biosensores, portadores de fármacos e ingeniería de tejidos principalmente debido a su parecido con la matriz extracelular (MEC) y la gran relación área a volumen [63,64].

El electrohilado es la técnica más utilizada en la síntesis de nanofibras debido a su configuración simple, económica y su versatilidad en la modulación de las propiedades finales de las nanofibras [65]. En la figura 2.6 podemos observar un ejemplo de la morfología

de nanofibras poliméricas de PVA/PNIPAM realizadas en esta investigación y que se hablarán de ellas en los próximos capítulos.

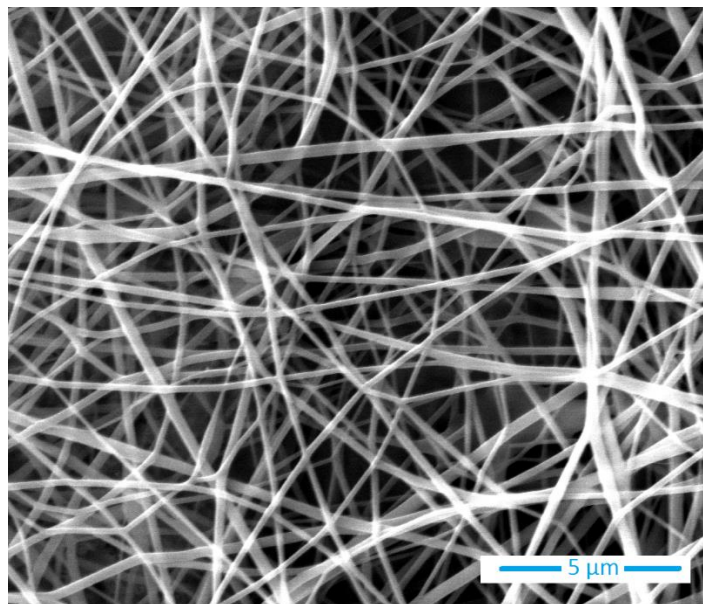


Figura. 2.6 Morfología de nanofibras de PVA/PNIPAM

Es importante destacar que la morfología de las nanoestructuras, ya sean NTS o nanofibras, afecta las propiedades intrínsecas de los materiales y su biocompatibilidad [66].

2.3.4 Control de liberación por medio de una película polimérica

Las soluciones poliméricas han sido ampliamente usadas en la generación de películas como recubrimientos en la liberación y retención de fármacos. El uso de revestimientos de películas poliméricas ya sea en el uso de stents con el fin de retrasar la liberación del fármaco y así tener un efecto de liberación más controlada. Se ha informado que, durante el uso prolongado de implantes con recubrimiento poliméricos, la degradación de la capa polimérica puede inducir una respuesta inflamatoria, activando los fagocitos y aumentando la proliferación del músculo liso vascular, lo que puede llevar al fracaso del implante.

A continuación, se presenta la tabla 3 de ejemplos de sistemas de liberación de fármacos, conformados con TNT cargados.

Tabla 3. Resumen de sistemas de liberación utilizados nanotubos como medio de carga en liberación de fármacos [67].

Sistema de suministro de medicamento	Modelo de drogas	Modelo experimental	Resultados	Aplicaciones
Nanotubos de titania cargados con antibióticos anodizados a partir de titanio	Gentamicina	Staphylococcus epidermis	Los nanotubos cargados de gentamicina fueron efectivos para minimizar la adhesión bacteriana inicial y estas superficies también soportaron una mayor adhesión y proliferación celular hasta 7 días de cultivo en comparación con las superficies de titanio.	Prevención de la adhesión bacteriana a las superficies de los implantes.
Liberación del fármaco a partir de nanotubos PLGA / TiO2 compuestos en la superficie del implante Ti	Ibuprofeno	PBS a pH 7,4 y 37 ° C	El uso de una combinación de nanotubos de PLGA y TiO2 aumentó las tasas de liberación del fármaco del 100% en 30 minutos, a 5 días (PLGA de bajo peso molecular) y 9 días (PLGA de alto peso molecular).	Mejora en las tasas de liberación de fármacos y promoción del crecimiento óseo.
Liberación de agentes terapéuticos de matrices de nanotubos de TiO2 en superficies de titanio	Vancomicina, plata	PBS a 37 ° C	El área de superficie aumentada por nanotubos, aumento la cantidad potencial de fármaco que se puede cargar en la superficie del implante. La cinética de liberación se puede adaptar ajustando los parámetros de anodización y la composición del electrolito.	Sistema de entrega de agentes antimicrobianos.
Matrices de nanotubos TiO2 cargadas con péptidos antimicrobianos (AMP) en implantes de titanio	AMP HHC-36 de amplio espectro	S. aureus	El HHC-36 se cargó en nanotubos de TiO2 mediante absorción física asistida por vacío. Los nanotubos de anatasa mostraron una mejor carga de AMP que la fase amorfa. La superficie AMP / TiO2 mató significativamente a S. aureus y redujo la adhesión bacteriana.	Prevención y reducción de infecciones per-implantarias.

En la figura 2.7, se puede observar un sistema de liberación encapsulado con una película polimérica. Dependiendo de los parámetros del espesor de la película, las propiedades químicas y la degradabilidad de esta película polimérica, se estudió la liberación de fármaco controlable y sostenida, en este caso se utilizó el quitosano ya que se reconoce como un material ideal para promover propiedades antibacterianas y de osteointegración, y la indometacina un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, que se seleccionó para este estudio como el modelo de fármacos insolubles en agua. En este ejemplo se exploraron las características de liberación de fármacos del sistema para demostrar su potencial para el

desarrollo de nanotubos de titanio (TNT) como implantes liberadores de fármacos con características de liberación de fármacos [68].

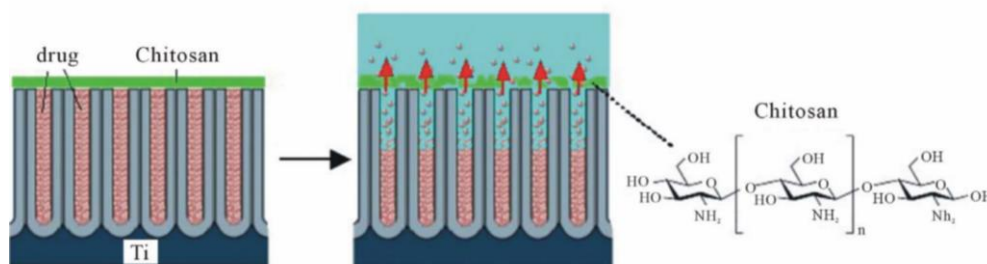


Figura. 2.7 Sistema de liberación conformado por una capa de polímero de quitosán recubierta en la parte superior de TNT se usó para controlar la liberación del fármaco de los nanotubos. PBS = Solución salina de fosfato [68].

2.4 Referencias

- [1]. Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. The Lancet. 358 (2001) 903-911.
- [2]. Davignon J-L, Hayder M, Baron M, Boyer J-F, Constantin A, Apparailly F, et al. Targeting monocytes/macrophages in the treatment of rheumatoid arthritis. Rheumatology. 52 (2013) 590-598.
- [3]. Kinne RW, Bräuer R, Stuhlmüller B, Palombo-Kinne E, Burmester G-R. Macrophages in rheumatoid arthritis. Arthritis Res. Ther. 2 (2000) 189-202.
- [4]. I.B. McInnes, J.R. O'Dell, State-of-the-art: rheumatoid arthritis. Ann. Rheum. Dis. 69 (11) (2010) 1898-1906.
- [5]. Crowson C, Matteson E, Myasoedova E, Michet C, Ernste F, Warrington K. The lifetime risk of adult-onset rheumatoid arthritis and other inflammatory autoimmune rheumatic diseases, Arthritis Rheum. 2011 Mar; 63(3):633-9. doi:10.1002/art.30155.
- [6]. Peláez-Ballestas I, Sanin LH, Moreno-Montoya J, Álvarez-Nemegyei J, BurgosVargas R, Garza-Elizondo M, et al., Grupo de Estudio Epidemiológico de Enfermedades Músculo Articulares (GEEMA). Epidemiology of the rheumatic diseases in Mexico. A study of 5 regions based on the COPCORD methodology. J Rheumatol. 2011; 86:3-8
- [7]. J. Braun, R. Rau, An update on methotrexate. Curr. Opin. Rheumatol. 21 (3) (2009) 216-223.
- [8]. K. Visser, W. Katchamart, E. Loza, J.A. Martinez-Lopez, C. Salliot, J. Trudeau, C. Bombardier, L. Carmona, D. van der Heijde, J.W.J. Bijlsma, D.T. Boumpas, H. Canhao, C.J. Edwards, V. Hamuryudan, T.K. Kvien, B.F. Leeb, E.M. Martin-Mola, H. Mielants, U. Muller-Ladner, G. Murphy, M. Ostergaard, I.A. Pereira, C. Ramos-Remus, G.

- Valentini, J. Zochling, M. Dougados, Multinational evidence-based recommendations for the use of methotrexate in rheumatic disorders with a focus on rheumatoid arthritis: integrating systematic literature research and expert opinion of a broad international panel of rheumatologists in the 3E Initiative. *Ann. Rheum. Dis.* 68 (7) (2009) 1086-1093.
- [9]. E.G. Favalli, M. Biggioggero, P.L. Meroni, Methotrexate for the treatment of rheumatoid arthritis in the biologic era: Still an "anchor" drug? *Autoimmunity Rev.* 13 (11) (2014) 1102-1108.
- [10]. J.W. van der Heijden, B.A.C. Dijkmans, R.J. Scheper, G. Jansen, Drug Insight: resistance to methotrexate and other disease-modifying antirheumatic drugs - from bench to bedside. *Nat. Clin. Pract. Rheum.* 3 (1) (2007) 26-34.
- [11]. M. Ferrari, Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges. *Nat. Rev. Cancer* 5 (3) (2005) 161-171.
- [12]. Q.H. Sun, M. Radosz, Y.Q. Shen, Challenges in design of translational nanocarriers. *J. Control. Release* 164 (2) (2012) 156-169.
- [13]. R.M. Michaels, D.J. Nashel, A. Leonard, A.J. Sliwinski, S.J. Derbes, *Arthritis Rheum.* 25 (1982) 339-341.
- [14]. J.M. Kremer, J.K. Lee, *Arthritis Rheum.* 29 (1986) 822-831.
- [15]. M.E. Weinblatt, H. Kaplan, B.F. Germain, R.C. Merriman, S.D. Solomon, B. Wall, L. Anderson, S. Block, R. Small, F. Wolfe, *J. Rheumatol.* 18 (1991) 334-338.
- [16]. Y. Yazici, D. Erkan, S.A. Paget, *J. Rheumatol.* 29 (2002) 1586-1589.
- [17]. L.M. Buckley, C.A. Bullaboy, L. Leichtman, M. Marquez, *Arthritis Rheum.* 40 (1997) 971-973.
- [18]. D.E. Furst, J.M. Kremer, *Arthritis Rheum.* 31 (1988) 305-314.
- [19]. Goeun Choi , Tae-Hyun Kim , Jae-Min Oh , Jin-Ho Choy Emerging nanomaterials with advanced drug delivery functions; focused on methotrexate delivery *Coordination Chemistry Reviews* 359 (2018) 32-51
- [20]. C. Chen, P. Gunawan, X.W. Lou, R. Xu, *Adv. Funct. Mater.* 22 (2012) 780-787.
- [21]. Zitter, H. Plenk Jr.: The Electromechanical Behaviour of Metallic Implant Materials as an Indicator of their Biocompatibility, *J. Biomed. Mater. Res.* 21 (1987) 881
- [22]. H.J. Rätzer-Scheibe, H. Buhl: Repassivation of Titanium and Titanium Alloys. *Titanium Science and Technology AIME* (1984) 2641.
- [23]. S.G. Steinemann, S.M. Perren: Titanium as Metallic Biomaterials. *Ti'84 Science and Technology*. Eds. G. Lütjering, U. Zwicker, W. Bunk (1984) 1327.

- [24]. J. Breme, E. Steinhäuser, G. Paulus: Plate/screw system according to Steinhäuser of cp-Ti for maxillofacial surgery, *Biomaterials* 9 (1988) 310 .
- [25]. H. Kawahara: Cellular responses to implant materials: biological, physical and chemical factors, *Int. Dent. J.* 33 (1984) 350.
- [26]. K.S. Brammer, C.J. Frandsen, S. Jin, TiO₂ nanotubes for bone regeneration, *Trends Biotechnol.* 30 (2012) 315–322. doi:10.1016/j.tibtech.2012.02.005.
- [27]. M. Long, H.J. Rack, Titanium alloys in total joint replacement--a materials science perspective., *Biomaterials.* 19 (1998) 1621–1639. doi:10.1016/S0142- 9612(97)00146-4.
- [28]. L.C. Campanelli, C.C. Bortolan, P.S.C.P. da Silva, C. Bolfarini, N.T.C. Oliveira, Effect of an amorphous titania nanotubes coating on the fatigue and corrosion behaviors of the biomedical Ti-6Al-4V and Ti-6Al-7Nb alloys, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 65 (2017) 542–551. doi:10.1016/j.jmbbm.2016.09.015.
- [29]. A. Shivaram, S. Bose, A. Bandyopadhyay, Mechanical degradation of TiO₂ nanotubes with and without nanoparticulate silver coating, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 59 (2016) 508–518. doi:10.1016/j.jmbbm.2016.02.028.
- [30]. X. Hu, H. Shen, K. Shuai, E. Zhang, Y. Bai, Y. Cheng, X. Xiong, S. Wang, J. Fang, S. Wei, Surface bioactivity modification of titanium by CO₂ plasma treatment and induction of hydroxyapatite: In vitro and in vivo studies, *Appl. Surf. Sci.* 257 (2011) 1813–1823. doi:10.1016/j.apsusc.2010.08.082.
- [31]. P. Roy, S. Berger, P. Schmuki, TiO₂ nanotubes: Synthesis and applications, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 50 (2011) 2904–2939. doi:10.1002/anie.201001374.
- [32]. J.M. Macak, H. Tsuchiya, A. Ghicov, K. Yasuda, R. Hahn, S. Bauer, P. Schmuki, TiO₂ nanotubes: Self-organized electrochemical formation, properties and applications, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 11 (2007) 3–18. doi:10.1016/j.cossms.2007.08.004.
- [33]. N. Hu, N. Gao, M.J. Starink, The influence of surface roughness and high pressure torsion on the growth of anodic titania nanotubes on pure titanium, *Appl. Surf. Sci.* 387 (2016) 1010–1020. doi:10.1016/j.apsusc.2016.07.036.
- [34]. Kulkarni, M., Mazare, A., Schmuki, P., & Iglič, A. Biomaterial surface modification of titanium and titanium alloys for medical applications. *Nanomedicine*, 111, 111.
- [35]. U.R Evans, *Corrosiones Metálicas*, Editorial Reverté, ISBN 84-291-6044- 2, (2003).
- [36]. C. A.Grimes, G. K.Mor, *TiO₂ Nanotube Arrays: Synthesis, Properties, and Applications*, in, Springer, 2009, pp. 358.

- [37]. J. Wang, Z. Lin, Anodic Formation of Ordered TiO₂ Nanotube Arrays: Effects of Electrolyte Temperature and Anodization Potential, *The Journal of Physical Chemistry C*, 113 (2009) 4026-4030.
- [38]. C.L. Chok, B.L. NG, F.K. Yam, The effects of fluoride-based electrolyte concentrations on the morphology of self-organized titania nanotubes, *Optoelectronics and advanced materials – rapid communications*, 4 (2010) 148-150.
- [39]. Poulomi Roy, Steffen Berger, and Patrik Schmuki, TiO₂ Nanotubes: Synthesis and Applications, *Angewandte Chemie International Edition*, Vol. 50, Issue 13, pp. 2904 – 2939, (2011).
- [40]. Hernández López, J. M. (2015). Funcionalización superficial de aleaciones de titanio mediante anodizado para aplicaciones biomédicas.
- [41]. Qiang Liu, Dongyan Ding, and Congqin Ning, “Anodic Fabrication of Ti-Nb- Zr-O Nanotube Arrays,” *Journal of Nanomaterials*, vol. 2014, Article ID 240346, 7 pages, 2014. doi:10.1155/2014/240346. 35. Z. H. Li, C. Q. Ning, D. Y. Ding, H. G. Liu, and L. Huang, “Biological properties of Ti-Nb-Zr-O nanostructures grown on Ti35Nb5Zr alloy,” *Journal of Nanomaterials*, vol. 2012, Article ID 834042, 7 pages, 2012.
- [42]. Losic D, Simovic S. Self-ordered nanopore and nanotube platforms for drug delivery applications. *Expert Opin Drug Deliv*. 2009; 6:1363–1381.
- [43]. Zwilling V, Darque-Ceretti E, Boutry-Forveille A, David D, Perrin MY, Aucouturier M. Structure and physicochemistry of anodic oxide films on titanium and TA6V alloy. *Surf Interface Anal*. 1999; 27:629–637.
- [44]. Wang, Q., Huang, J. Y., Li, H. Q., Chen, Z., Zhao, A. Z. J., Wang, Y., ... & Lai, Y. K. (2016). TiO₂ nanotube platforms for smart drug delivery: a review. *International journal of nanomedicine*, 11, 4819.
- [45]. Gulati K, Kant K, Findlay D, Losic D. Periodically tailored titania nanotubes for enhanced drug loading and releasing performances. *J Mater Chem B*. 2015; 3:2553–2559.
- [46]. Aw MS, Gulati K, Losic D. Controlling drug release from titania nanotube arrays using polymer nanocarriers and biopolymer coating. *Biomater Nanobiotech*. 2011; 2:477–484.
- [47]. M.A. Stuart, W.T. Huck, J. Genzer, M. Muller, C. Ober, M. Stamm, G.B. Sukhorukov, I. Szleifer, V.V. Tsukruk, M. Urban, F. Winnik, S. Zauscher, I. Luzinov, S. Minko, *Nat. Mater*. 9 (2010) 101–113.

- [48]. Jia H, Kerr LL. Kinetics of drug release from drug carrier of polymer/TiO₂ nanotubes composite-pH dependent study. *J Appl Polym Sci.* 2015;132:41750.
- [49]. Cai K, Jiang F, Luo Z, Chen X. Temperature-responsive controlled drug delivery system based on titanium nanotubes. *Adv Eng Mater.* 2010;12:B565–B570.
- [50]. Guo R, Zhang L, Qian H, Li R, Jiang X, Liu B. Multifunctional nanocarriers for cell imaging, drug delivery, and near-IR photothermal therapy. *Langmuir.* 2010;26:5428–5434.
- [51]. Aw MS, Kurian M, Losic D. Non-eroding drug-releasing implants with ordered nanoporous and nanotubular structures: concepts for controlling drug release. *Biomater Sci.* 2014;2:10–34.
- [52]. Aw MS, Addai-Mensah J, Losic D. Magnetic-responsive delivery of drugcarriers using titania nanotube arrays. *J Mater Chem.* 2012;22:6561–6563.
- [53]. Aw MS, Losic D. Ultrasound enhanced release of therapeutics from drug-releasing implants based on titania nanotube arrays. *Int J Pharm.* 2013;443:154–162.
- [54]. N. Yamada, T. Okano, H. Sakai, F. Karikusa, Y. Sawasaki, Y. Sakurai, *Makromol. Chem.-Rapid 11* (1990) 571–576.
- [55]. X. Lin, D. Tang, S. Gu, H. Du, E. Jiang, *New J. Chem.* 37 (2013) 2433–2439.
- [56]. I. Tokarev, S. Minko, *Soft Matter* 5 (2009) 511–524.
- [57]. M.E. Harmon, T.A.M. Jakob, W. Knoll, C.W. Frank, *Macromolecules* 35 (2002) 5999–6004.
- [58]. R. Elashnikov, M. Radocha, S. Rimpelova, V. Švorčík, O. Lyutakov, *RSC Adv.* 5 (2015) 86825–86831.
- [59]. C.M. Schilli, M. Zhang, E. Rizzardo, S.H. Thang, Y.K. Chong, K. Edwards, G. Karlsson, A.H.E. Müller, *Macromolecules* 37 (2004) 7861–7866.
- [60]. Y. Cao, C. Zhang, W. Shen, Z. Cheng, L.L. Yu, Q. Ping, *J. Control. Release* 120 (2007) 186–194. [23] X. Gao, Y. Cao, X. Song, Z. Zhang, C. Xiao, C. He, X. Chen, *J. Mater. Chem. B* 1 (2013) 5578–5587.
- [61]. S. Sinha-Ray, Y. Zhang, D. Placke, C.M. Megaridis, A.L. Yarin, *Langmuir* 26 (2010) 10243–10249.
- [62]. Barnes CP, Sell SA, Boland ED, Simpson DG, Bowlin GL. Nanofiber technology : Designing the next generation of tissue engineering scaffolds. 2007;59:1413-1433. doi:10.1016/j.addr.2007.04.022.

- [63]. Uzun SD, Kayaci F, Uyar T, Timur S, Toppare L. Bioactive Surface Design Based on Functional Composite Electrospun Nano fi bers for Biomolecule Immobilization and Biosensor Applications. 2014. doi:10.1021/am5005927.
- [64]. Feng XJ, Macak JM, Albu SP, Schmuki P. Electrochemical formation of self-organized anodic nanotube coating on Ti-28Zr-8Nb biomedical alloy surface. *Acta Biomater.* 2008;4(2):318-323. doi:10.1016/j.actbio.2007.08.005.
- [65]. Bhardwaj N, Kundu SC. Electrospinning : A fascinating fi ber fabrication technique. 2010;28:325-347. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.01.004.
- [66]. Deitzel J., Kleinmeyer J, Harris D, Beck Tan N. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer (Guildf).* 2001;42(1):261-272. doi:10.1016/S0032-3861(00)00250-0.
- [67]. Prakasam HE, Shankar K, Paulose M, Varghese OK, Grimes CA. A new benchmark for TiO₂ nanotube array growth by anodization. *J Phys Chem C.* 2007;111(20):7235-7241. doi:10.1021/jp070273h.
- [68]. Aw MS, Gulati K, Losic D. Controlling Drug Release from Titania Nanotube Arrays Using Polymer Nanocarriers and Biopolymer Coating. *J Biomater Nanobiotechnol.* 2011;02(05):477-484. doi:10.4236/jbnt.2011.225058.

3. TÉCNICAS EXPERIMENTALES

3.1 Introducción

En el presente trabajo se llevó a cabo; La síntesis de nanotubos de titanio y de aleación TiNi equiatómica (44%-Ti, 55.85%-Ni) por medio de la técnica de anodizado electroquímico, la síntesis de nanofibras de PVA/PNIPAM utilizando la técnica de electrohilado, la síntesis de una película de PVA/PNIPAM por evaporación de solventes. Los nanotubos fueron cargados con el fármaco metotrexato mediante la técnica dip coating. Una vez, cargados los nanotubos con MTX se realizó el electrohilado de nanofibras de PVA/PNIPAM, sellando los nanotubos y creando uno de los sistemas de liberación propuesto. Además, los nanotubos fueron sellados usando la película de PVA/PNIPAM sintetizada por evaporación de solventes. De esta manera, tres sistemas de liberación se usaron para la liberación del fármaco MTX; 1. Liberación de MTX en los nanotubos, 2. Liberación de MTX en el sistema nanotubos-nanofibras y 3. Liberación de MTX en el sistema nanotubos-película. Cada prueba se realizó sobre nanotubos que crecieron a partir de placas de Ti y de TiNi por lo que en total serían seis sistemas de liberación. Para la liberación se suministró buffer de fosfato PBS (phosphate buffered saline) tomando y rellenando la cantidad tomada, cada determinado tiempo (5min, 1hr, 1dia y 30 dias), comparando la liberación de nanotubos-MTX, nanotubos-MTX-nanofibras, nanotubos-MTX-películas. La caracterización de todas las pruebas se realizó por medio de SEM y UV-VIS. En la figura 3.1 se presenta de manera esquemática la metodología descrita.

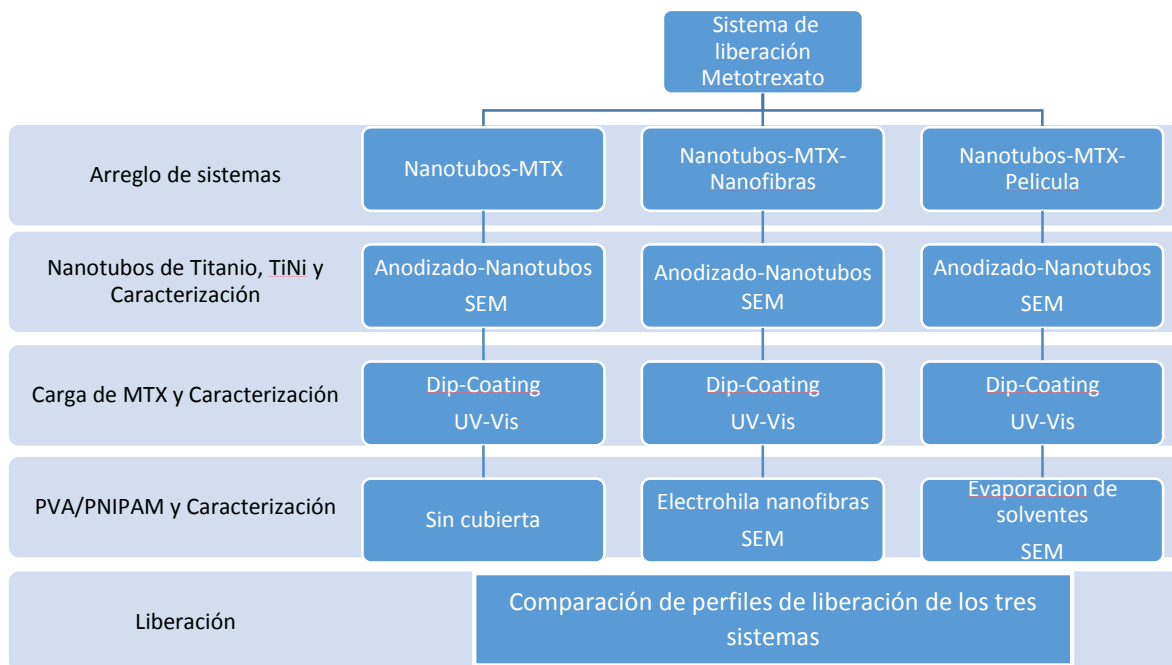


Figura 3.1 Esquema general de la parte experimental de este trabajo

3.2 Equipos utilizados

3.2.1 Fuente de voltaje para anodizado

Se utilizó una fuente de voltaje, esta cuenta con una perilla de rango de voltaje de .001v hasta un máximo de 60v de corriente directa y de amperaje de .001A a 10A, tres conectores de corriente (positivo, negativo y tierra), el dispositivo forma parte del montaje de la técnica anodizada que sirvo para creación de nano estructuras (nanotubos). El equipo es marca BK Precisión 9110 como se puede observar en la figura 3.2.



Figura 3.2 Fuente de voltaje BK Precisión utilizado en este proyecto.

3.2.2 Equipo de Electrohilado

Se usó el sistema de electrohilado compuesto por una fuente de alto voltaje de corriente directa de 0v a 30kv marca Gamma, conectada a una bomba de inyección donde se pueden montar jeringas, a su vez, cuenta con un sistema de programable de empuje por ml/h marca New Era Pump Systems, Modelo No. NE-300, y un brazo sujetador de muestras, este modelo de electrohilado fue utilizado en este proyecto para la generación de nanofibras mediante un circuito cerrado de colector y aguja, se puede apreciar en la siguiente figura 3.3.

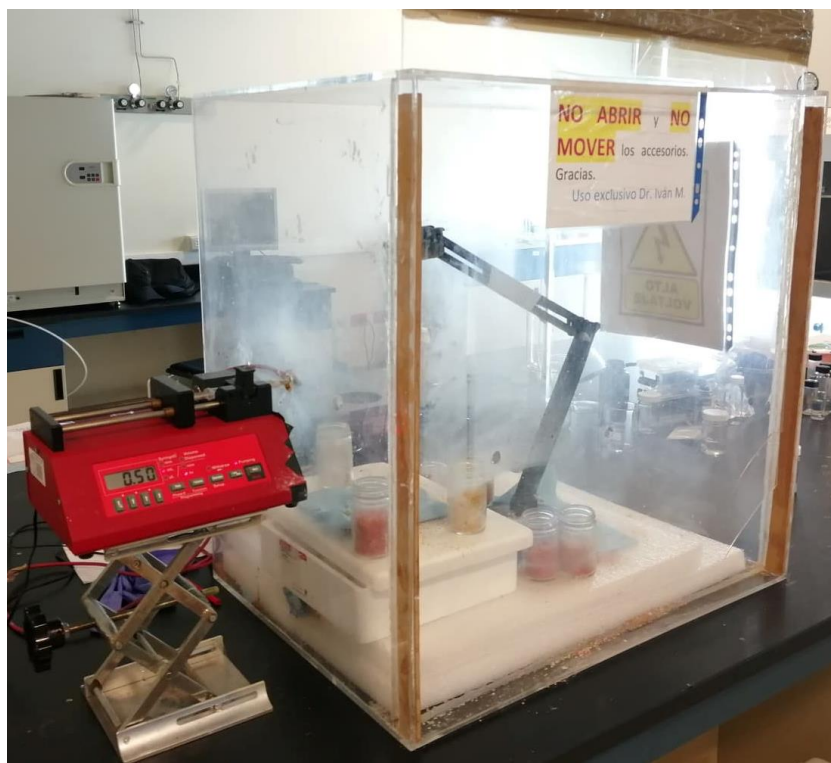


Figura 3.3 Maquina electrohilado usado en este proyecto.

3.2.3 Espectrofotómetro de ultravioleta-visible (UV/Vis)

En esta investigación se utilizó Espectrómetro UV-Vis para identificar las bandas de absorción de muestras que tengan presente el fármaco (metotrexato) en la longitud de onda 305 nm, mediante la carga de la solución disuelta en agua desionizada en cubetas de cuarzo para espectrofotómetro UV-VIS de 3.5ml, el equipo cuenta con una sección de montaje de muestras (blanco y muestra) de donde pasa el haz de fotones en las muestras que provoca transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas, estas mediciones pasan al equipo de cómputo donde son analizadas. El equipo utilizado es el espectrómetro UV-Vis-NIR Cary series 5000 de Agilent Technologies. En la figura 3.4 se muestra el equipo que se utilizó.



Figura 3.4 Espectrómetro UV-Vis NIR usado en esta investigación

3.2.4 Microscopio Electrónico de Barrido. (SEM)

En este trabajo el SEM (scanning electron microscope) se utilizó EDX (Energy-dispersive Xray) para conocer la morfología y espesor de nanotubos y nanofibras de las muestras obtenidas. El equipo utilizado es marca FEI, modelo Nova NanoSEM 200. Ver imagen 3.5



Figura 3.5 Microscopio Electrónico de Barrido utilizado en este estudio

3.2.5 Dip Coating

El equipo utilizado Dip Coating cuenta con un sistema automatizado de control de servo motores de acenso y descenso, visualizado por una pantalla táctil que permite introducir una serie de pasos programados, realizando ciclos de trabajo, en este trabajo se utilizó esencialmente para montar las muestras de Ti y TiNi, generando películas de polímero y medicamentos en su superficie. El equipo fue creado por alumnos de mecatrónica por medio de un proyecto de investigación de la facultad de ingeniería mecánica y eléctrica (UANL). (ver figura 3.6).



Figura 3.6. Máquina utilizada para realizar Dip Coating

3.2.6 Cortadoras automática y manual

En este trabajo se utilizó dos cortadoras marca struers que cuentan con un disco de diamante y un sistema de enfriamiento por agua, como se observa en la siguiente figura 3.7, en el inciso A) la cortadora manual que se utilizó en un inicio para realizar el primer corte de la barra de TiNi y placa titanio, obteniendo un tamaño más fácil para su manipulación, se utilizó la cortadora programable B) para tener cortes más precisos de cada muestras, la cual cuenta con un riel desplazable, que es posible programar en lapsos de tiempo y velocidad de revoluciones por segundo (rps) que puede dar el equipo.

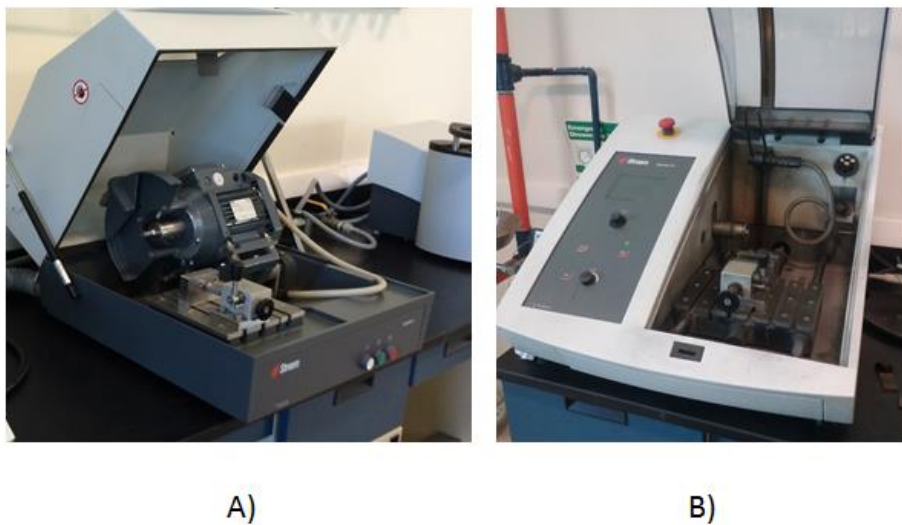


Figura 3.7 Cortadoras marca struers, A) Cortadora manual, B) Cortadora de precisión programable

3.3 Síntesis de nanotubos

3.3.1 Síntesis de nanotubos de titanio y de la aleación de TiNi por anodizado electroquímico

La barra de TiNi y la placa de titanio fueron cortadas por el equipo de corte, y posteriormente a cada muestra se le dio un baño químico (decapado) para eliminar cualquier impureza que generara el corte.

Se utilizó la técnica de anodizado para la síntesis de los nanotubos. Manipulando los parámetros como; voltaje, tiempo y electrolito, se puede controlar las características morfológicas de los del nanotubo. Se procedió a tomar las muestras titanio de 2cm de largo y 1cm de ancho, mientras que las muestras de TiNi fueron de 12mm de diámetro y un espesor de 4mm. Seguido de eso, las muestras fueron sumergidas en un ataque químico para quitar posibles impurezas generadas por los cortes.

Las muestras de titanio y de la aleación de TiNi se lijaron haciendo una acción de desbaste hasta tomar un tono gris opaco, en seguida se les dio un pulido para poder darle un acabado espejo y tener una superficie totalmente uniforme. Debido a que los mismos procesos fueron llevados a cabo en el Ti como en el TiNi, cuando nos refiramos a la muestra se deberá

entender que nos referimos tanto a la muestra de TiNi como la de Ti, al menos que otra cosa sea dicha.

A continuación, se procedió al anodizado electroquímico, para esto se utilizaron 60 mL de electrolito (.2mol/L NH_4F , 3mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 500ml $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$) cómo contra electrodo se utilizó una rejilla de platino. Como se muestra en la figura 3.8.

Una vez que se tuvieron listas las muestras y el lugar para hacer la reacción, se procedió a poner la muestra frente al contra electrodo a una distancia de 5 cm, los valores de voltaje fueron de 40 volts a 55 volts con intervalos de 5 volts por anodizado, el amperaje utilizado para todas las muestras fue de un Amper y el tiempo al cual se dejó anodizando fue de 2 horas. Las muestras anodizadas fueron sometidas a un tratamiento de limpieza el cual consistía en una mezcla de agua desionizada, etanol, metanol, y acetona 25:25:25:25 para así eliminar las sales y residuos producidos por el método antes hablado.

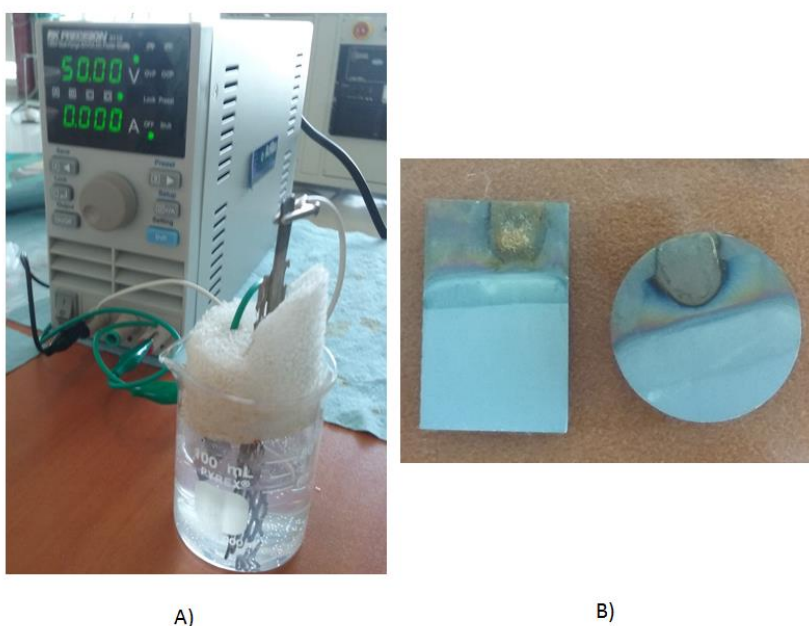


Figura 3.8. Representación del montaje de la técnica de anodizado; A) Circuito cerrado con electrodo de titanio y contra electrodo rejilla de platino sumergido en el electrolito, B) Acabado superficial de muestras de titanio y TiNi con la técnica de anodizado.

3.4 Método de carga para el fármaco metotrexato

Para la realización de la carga del se utilizó la técnica de dip coating. Para cargar el fármaco Metotrexato PHR1396-1G marca sigma-aldrich (MTX), disuelto en agua desionizada, se usó un programa con el número de ciclos necesarios en la máquina que se muestra en la figura 3.9.

Los pasos a seguir fueron los siguientes:

- Se fija por medio de un sujetador la muestra a cargar.
- Se pone un vaso de precipitado con menos de 1mg fármaco disuelto en agua desionizada para que al bajar el brazo se cubra la muestra.
- Los parámetros a seguir toman como referencia la carrera completa de la máquina y el tamaño de muestra previamente guardados en un programa.
- Se realizan un total de 24 ciclos en 5 horas

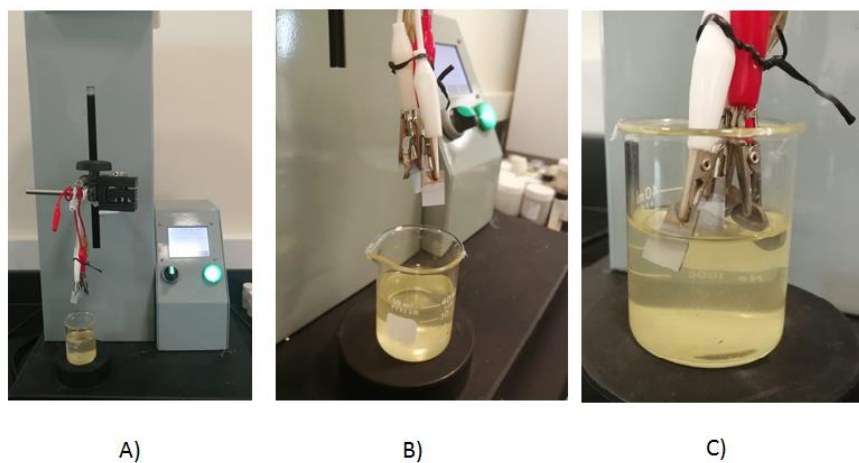


Figura 3.9. Representación del montaje del equipo de Dip coating para cargar con mtx;
A) Dip coating y solución de mtx, B) Muestras de Ti y TiNi en el dip-coating, C) Muestras sumergidas en la solución de mtx.

3.5 Generación de películas por evaporación de solventes

El método a usar para generar películas fue el siguiente: teniendo la muestra ya funcionalizada con nanotubos y cargada con el fármaco (MTX) se pasó a montarlos al dip coating donde se sumergieron en un vaso que contenía la solución PVA/PNIPAM, se realizó la misma programación utilizada de carga del MTX para generar la película polimérica uniforme, se dejó secar por 24 horas a temperatura ambiente después de los 24 ciclos y así se generó la capa uniforme sobre las muestras. Se observa en la siguiente figura 3.10.

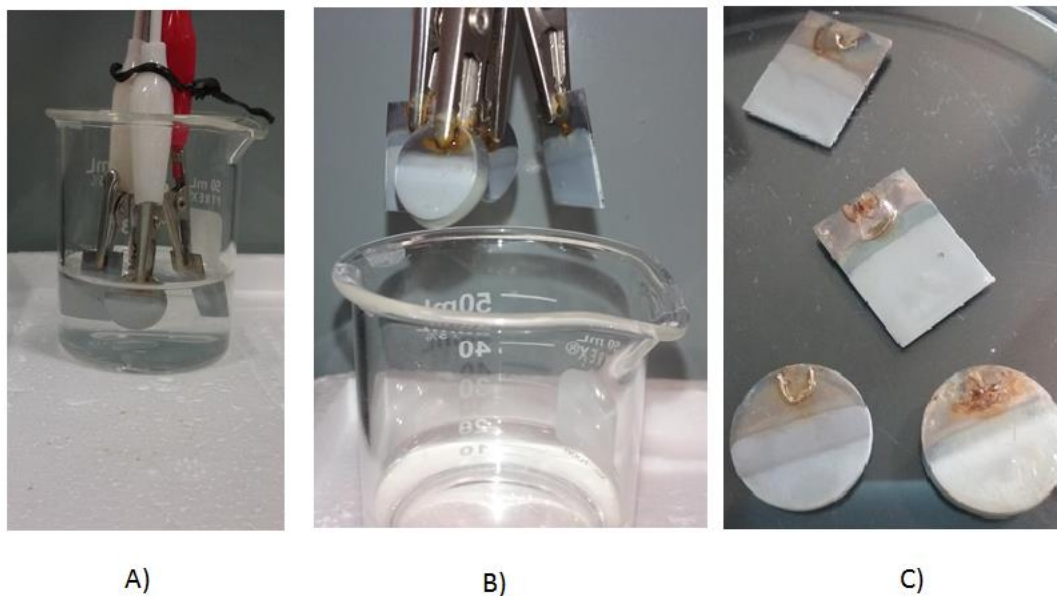


Figura 3.10. Representación del montaje de la técnica evaporación de solventes por dip coating; A) Muestras Ti y TiNi sumergidas en solución polimérica de PVA/PNIPAM, B) Muestras con película polimérica, C) Muestras secas con película polimérica.

3.6 Preparación de buffer de fosfato PBS

La preparación del buffer de fosfatos a PH 7.4 fue la siguiente: Se pesaron 3.17 gr de NaH_2PO_4 , 14,2gr de $\text{NaH}_2\text{KH}_2\text{PO}_4$ y 87.6 gr NaCl . Estos se mezclaron en 500ml de agua desionizada y se pusieron en agitación constante por un periodo de 1 hora a temperatura ambiente hasta que la mezcla se observó completamente homogeneizada como se puede observar en la siguiente figura 3.11.



Figura 3.11. Solución homogénea de PBS.

3.7 Síntesis de nanofibras

3.7.1 Síntesis de nanofibras por el método de Electrohilado

En esta investigación se utilizó una solución de PNIPAM 10% realizada por el método de polimerización de radicales libres disuelto en agua desionizada y una solución de PVA al 10% disuelta en agua desionizada, que servirá como soporte en la formación de nanofibras. Las soluciones de PNIPAM y PVA se mezclaron en una relación 1:4 en un vaso de precipitado con un imán de agitación hasta tener una solución homogénea. Para la realización de este estudio, se ha optado por la aplicación de la técnica de electrohilado, la ventaja de usar esta técnica es su fácil generación de nanofibras, en esta experimentación los parámetros fueron de una velocidad de empuje de fue 0.5ml/h, utilizando una corriente de 25 Kv, a una distancia entre ánodo (aguja de jeringa) y cátodo (colector de aluminio) de 10 cm. Como se puede observar en figura 3.12 inciso B).

Teniendo en cuenta los parámetros de experimentación usados en el electrohilado. En el colector de aluminio se agregó las muestras funcionalizadas con nanotubos, dando paso al siguiente apartado.

3.7.2 Electrohilado sobre nanotubos

Se utilizó la técnica de electrohilado sobre el área homogénea de nanotubos de las muestras, donde se depositarán las nanofibras al evaporar el disolvente. La bomba de inyección marca New Era PumpSystems, modelo No. NE-300, se utilizó para liberar la solución de PVA/PNIPAM, la velocidad utilizada para esta experimentación fue 0.5ml/h utilizando una corriente de 25 kV, a una distancia de 10 cm entre la aguja y el colector. Como se puede observar en la siguiente figura 3.12, A) Jeringa con solución montada en bomba, B) Circuito cerrado de ánodo (punta de aguja) a cátodo (colector de aluminio), C) Colector recubierto con fibras, D) Nanofibras en colector aluminio, E) Nanofibras en colector de TiNi y F) Nanofibras en colector de titanio.

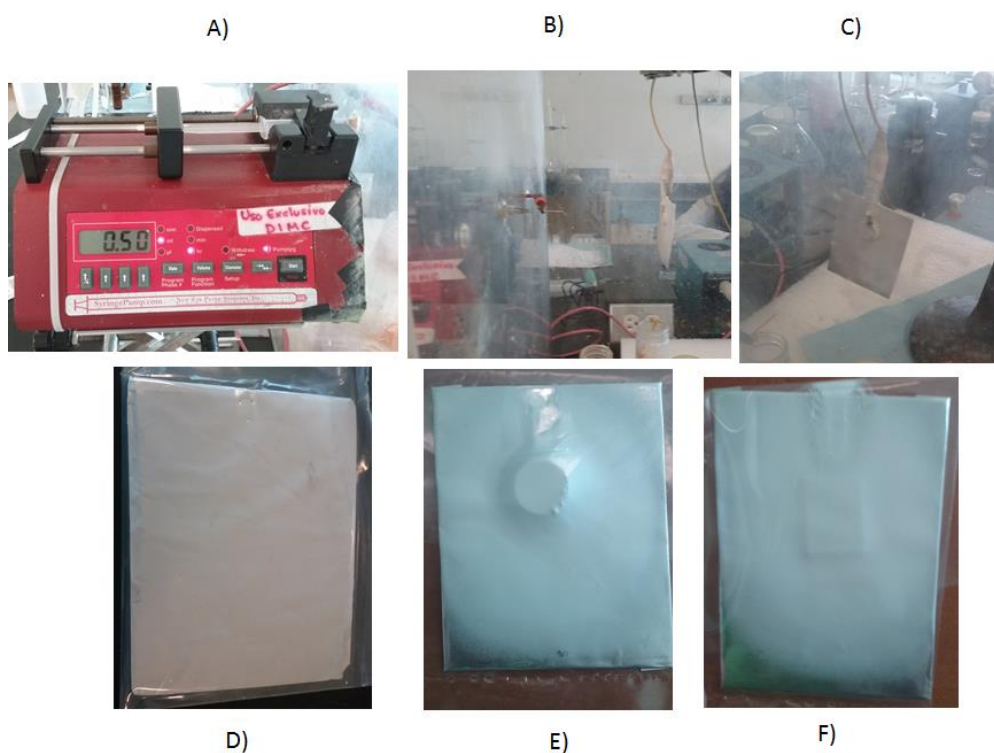


Figura 3.12. Representación del montaje de la técnica del electrohilado utilizado en la experimentación.

3.8 Medición de nanofibras y nanotubos

Para poder realizar las mediciones de nanofibras así como de los nanotubos durante la experimentación se utilizó el software Jmicro-view que permite la medición de imágenes por medio de una comparación o línea guía y transformando los pixeles de la imagen a unidades de medición (micrómetros). Obteniendo resultados que fueron exportados en Excel para realizar tablas de frecuencias pasando para generar los histogramas en Origin 8.

3.9 Liberación de sistemas propuestos

Teniendo los arreglos de sistemas de liberación Nanotubos-Metotrexato, Nanotubos-Metotrexato-Nanofibras y Nanotubos-Metotrexato-Película. Se realizó el ensayo de liberación colocando a cada muestra en una placa de cultivo celular de fondo plano 24 pozos estéril marca Corning™ 3526, de 3ml de volumen y 1.6cm de diámetro por cada pozo, que fue utilizado para simular los sistemas aislados. Cada pozo se llenó con PBS para así fomentar la liberación. Utilizando una micropipeta de 1ml se tomó de cada pozo 1.5 ml almacenándolo en eppendorf durante un tiempo específico para cada experimento (5 min, 1hr, 1dia, 1mes) y volviendo a rellenar con 1.5ml de PBS cada pozo tomado, dando un sistema acumulativo, como se observa en la figura 3.13. Teniendo las muestras en eppendorf se realizó la caracterización por UV-VIS generando una serie de datos con absorbancias de 305nm, que se exportaron para realizar las curvas de liberación utilizando el programa de Origin 8.

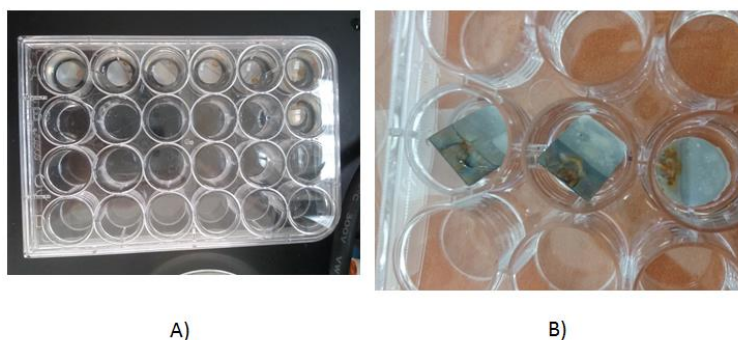


Figura 3.13. Representación del montaje de liberación de mtx es sistemas aislados; A) Celda de 24 pozos esterilizada y B) Muestras en sistemas aislados sumergidos en pbs.

En la siguiente Figura 3.14, se muestran las simulaciones en CAD de los diseños a realizar en esta investigación, conformada por los tres ensayos propuestos y cada uno cuenta con nanotubos, MTX (A) y en los ensayos (B) y (C) cuentan con una membrana polimérica ya sea en forma de nanofibras o película respectivamente.

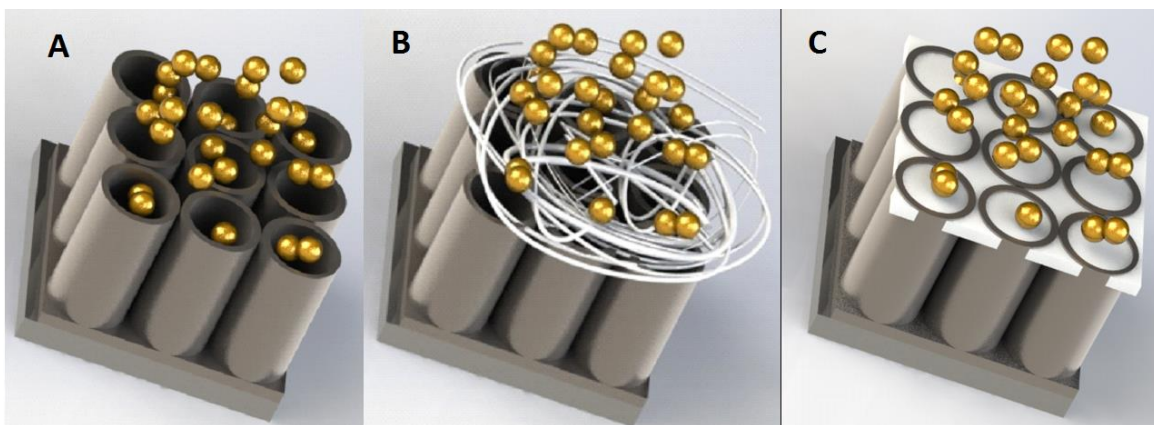


Figura 3.14 Representación de sistemas de liberación TNT-MTX A), TNT-MTX-Nanofibras B) y TNT-MTX-Película C) (Imágenes realizadas y renderizadas con Solidworks 2016).

3.10 Representación gráfica de experimentación

Por ultimo en esta investigación se muestras un diagrama con imágenes donde se puede observar las 5 diferentes fases que contempla este trabajo, también las diferentes técnicas que se usó, dando como resultado un inicio de muestra de titanio y TiNi, hasta tener los tres diferentes sistemas de liberación propuestos a un inicio de este proyecto. Ver imagen 3.15.

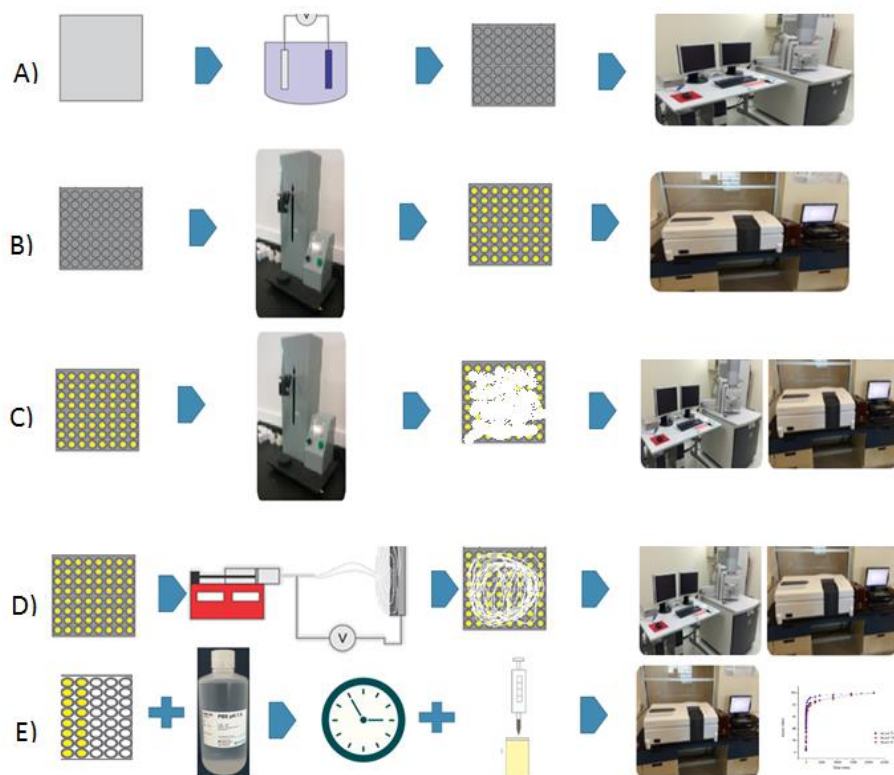


Figura 3.15. Representación gráfica de metodología total del proyecto A) Muestra de titanio pulida, Proceso de anodizado, B) Muestra anodizada, nanotubos cargados con MTX, C) Nanotubos cargadas con MTX tapados con película polimérica por dip counting D) Electrohilado sobre nanotubos cargados de MTX, E) Perfiles de liberación de muestras mediante un buffer(PBS).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Introducción.

En este capítulo se dan a conocer los resultados de los experimentos detallados en el capítulo anterior. Los primeros resultados que se muestran corresponden a la caracterización de muestras anodizadas de la aleación TiNi y titanio puro, en cuya superficie se aprecia una capa nanotubos. Posteriormente se presentan los resultados de las nanofibras obtenidas por la técnica de electrohilado, depositadas en las muestras. A su vez, utilizando la solución polimérica mediante evaporación de solventes como variante del sistema se creció una película polimérica en la superficie del metal. Para la caracterización del fármaco (MTX) y los perfiles de liberación se utilizó la espectrometría UV-Vis.

Por ultimo en este capítulo, se analizan y discuten los resultados de los perfiles de liberación, se comparan los resultados de los tres sistemas de liberación estudiados. 1. Liberación de MTX en nanotubos abiertos de Ti puro y aleación TiNi, 2. Liberación de MTX en nanotubos con una capa depositada de nanofibras conformadas de PVA/PNIPAM y 3.- En nanotubos con una película polimérica(PVA/PNIPAM) utilizando la técnica de evaporación de solvente.

4.2 Análisis morfológico de los nanotubos

Se observó una morfología uniforme de estructuras cilíndricas huecas a partir de la capa natural de Óxido que presenta el titanio y sus aleaciones. En la figura 4.1, se muestran los nanotubos crecidos a partir del Titanio 4.1 A) y de la aleación TiNi 4.1 B). Una importante diferencia observada en la morfología de los nanotubos de los dos materiales es en la aleación de TiNi se presenta una serie de caminos divisorios entre nanotubos, lo que no sucede en el caso del Ti, donde se observa una edificación de estructuras sin estos “caminos”. Este fenómeno puede deberse a la presencia de níquel y al tamaño de grano. [1]

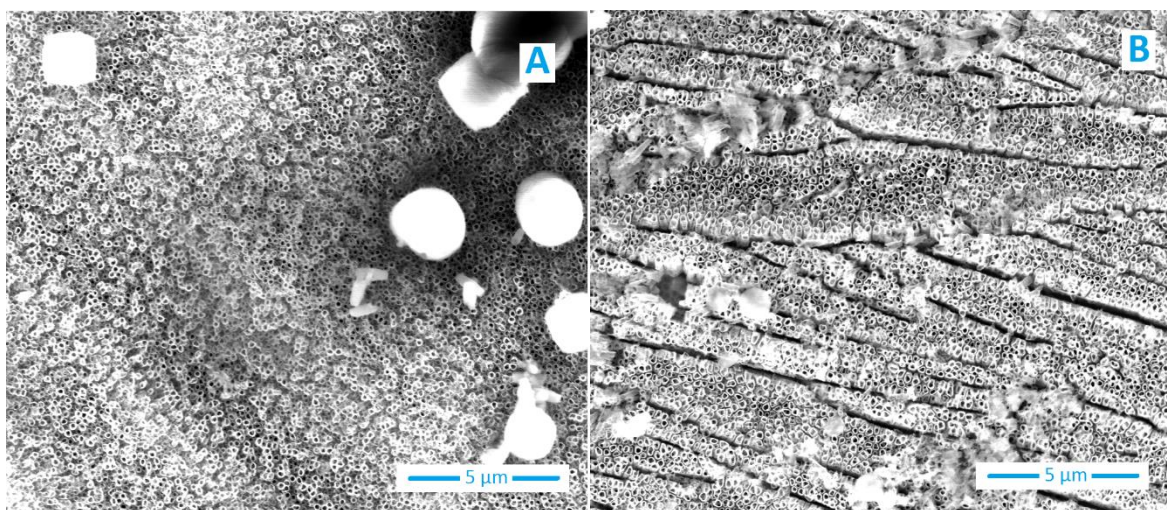


Figura 4.1 Muestras anodizadas de Ti A), TiNi B) en las que se observa nanotubos en toda el área superficial.

Teniendo en cuenta la formación obtenida de nanoestructuras se buscó manipular las condiciones de anodizado para crecer nanotubos con un diámetro óptimo y así poder utilizarlos como medio de carga o almacenamiento y generar el sistema de liberación deseado. Mediante la manipulación del voltaje de anodizado: 40V, 45V, 50V y 55V, se obtuvieron como resultados morfologías de nanotubos de diámetros interiores de 90-150nm, 120-210nm, 150-250nm y 200-300nm respectivamente, ver figura 5.2.

Cabe de resaltar que se realizaron anodizados con voltajes menores a 40V, se obtuvieron morfologías deformes y no uniformes, a su vez, se realizaron con voltajes superiores a 55V y estos nanotubos presentaban un diámetro muy amplio causando deformidades no propias de un nanotubo o simplemente la carencia de formación de nanotubos, estructuras colapsadas, también reportadas en otros estudios, ver imagen 4.2 A) y F). [2] Buscando una solución para darle más estabilidad a la formación de nanotubos se optó por utilizar etilenglicol. En un estudio similar se demostró que, con el uso de etilenglicol, aumentó la concentración de estructuras nanotubulares, la formación de nanotubos más rígidos y se obtuvo como resultado una matriz de nanotubos de diámetros más regulares, como se reporta en la literatura. [3].

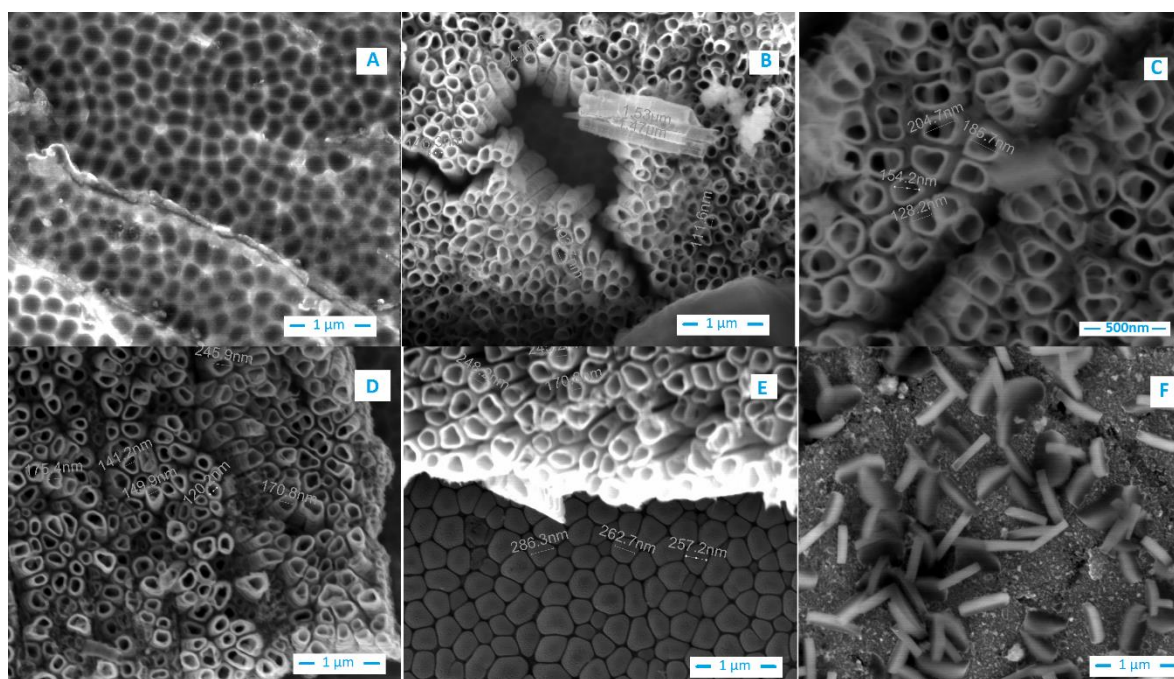


Figura 4.2 Muestras anodizadas 35V A), 40V B), 45V C), 50V D), 55V E) y 60V F).

Una vez obtenidas las morfologías anteriores, se decidió utilizar los nanotubos de 50V, ya que estos nanotubos presentan diámetros entre 150 a 250nm suficientes para poder albergar en su interior la molécula del metotrexato de dimensiones que oscilan en los de 120 a 250nm reportados en la literatura [4]. En la figura 4.3 se muestra la distribución de los diámetros de los nanotubos, es importante remarcar que el diámetro de los nanotubos es parte fundamental de la investigación ya que en base a ello se podrá optimizar la encapsulación y liberación del fármaco, pues el diámetro del nanotubo debe ser del orden de la molecula a encapsular.

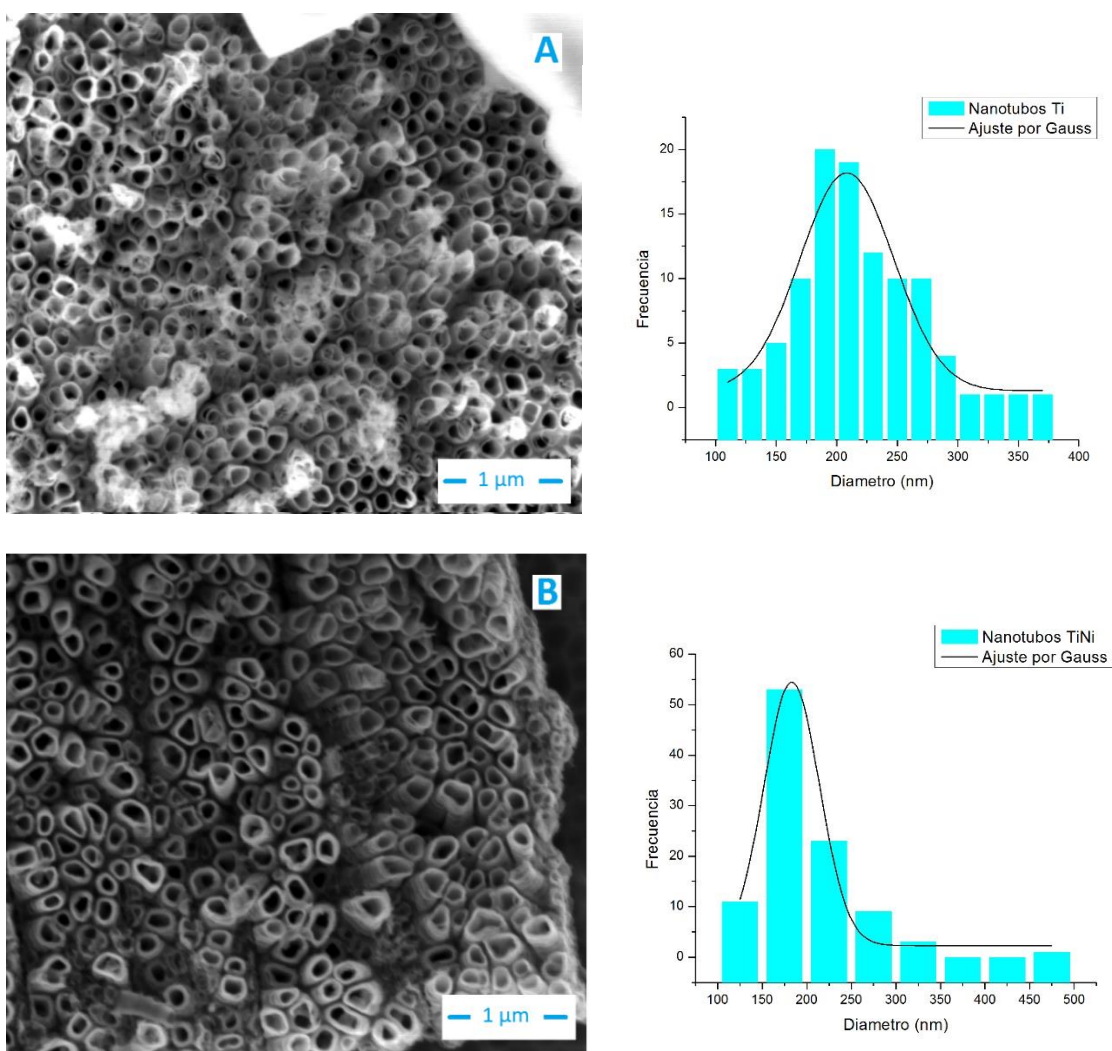


Figura 4.3 Morfología y distribución de diámetros de las muestras anodizada a 50V, A) Ti y B) TiNi,

Como ya se ha estudiado, en la técnica del anodizado es posible poder manipular no solamente el diámetro, variando el voltaje, sino también la longitud de los nanotubos, variando el tiempo de anodizado [5]. Tomando en cuenta esa ventaja, se realizaron anodizados a diferentes tiempos, estos fueron de 1hr y 2hr. Para optimizar la cantidad de fármaco a almacenar, se tiene en cuenta el diámetro y la longitud del nanotubo ya reportada en la literatura. Para tiempos de 1hr y voltajes de 50V la longitud obtenida fue de casi $1\mu\text{m}$ y para el mismo voltaje, pero anodizado por 2hr la longitud fue de casi $2\mu\text{m}$. Teniendo un medio receptor más amplio para su carga y retención de fármaco se optó por un voltaje de 50V y un tiempo de 2hr. Ver figura 4.4.

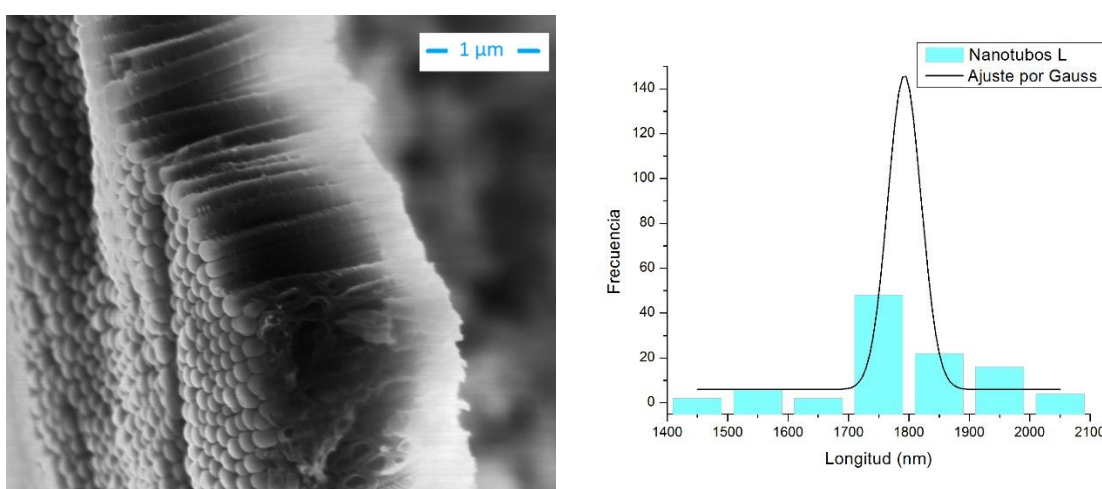


Figura 4.4 Nanotubos 50V, vistos desde una vista transversal y su distribución de tamaño.

4.3 Caracterización de metotrexato

La caracterización del fármaco se llevó a cabo en un espectrómetro de UV-Vis en longitud de onda 305nm y disuelto en agua desionizada de acuerdo a lo reportado en la literatura [6-8]. Tomando en cuenta los picos característicos del metotrexato (MTX) de 263nm y 305nm, se optó por tomar la medida de 305nm presente en dichas investigaciones, siendo la medida que más se apreciaba en los perfiles de liberación, sin corrimientos o desplazamientos. (Ver figura 4.5).

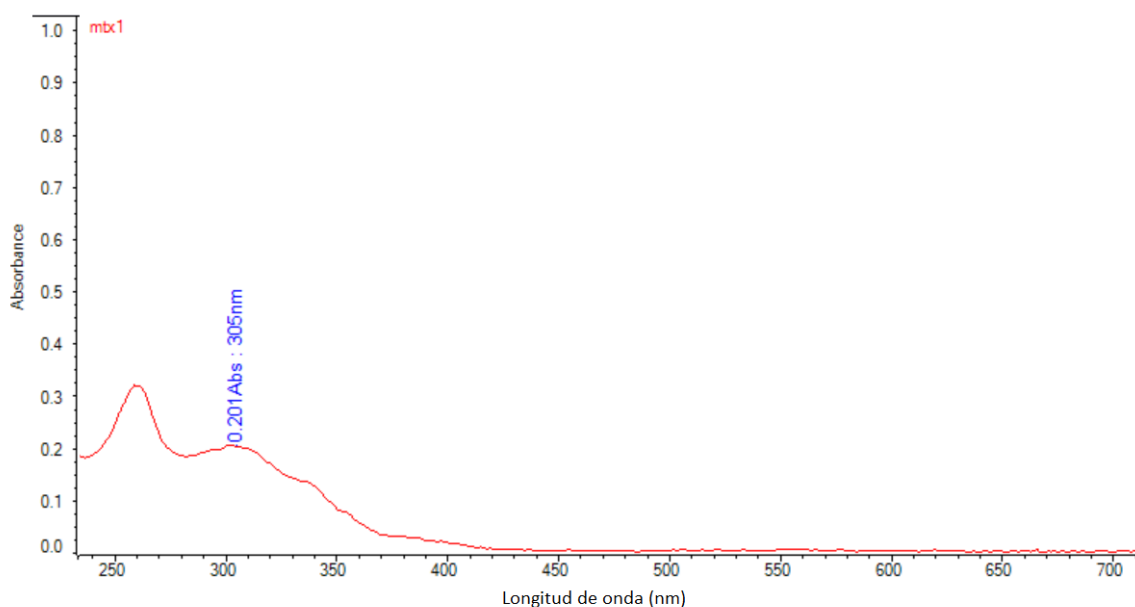


Figura 4.5 Espectrometría de UV-Vis Metotrexato.

4.4 Carga de nanotubos con metotrexato

En la figura 4.6, se observan las muestras de Ti y TiNi antes de su liberación de fármaco, se distingue un color gris claro debido al anodizado, con un brillo de color amarillo característico que presenta el metotrexato obtenido por la técnica de dip coating. También se calculó el área superficial de carga de las muestras teniendo un promedio de $6 \times 10^{11} \text{ nm}^2$ por muestra, siendo un total de 2.4×10^9 nanotubos aproximadamente en el área superficial.

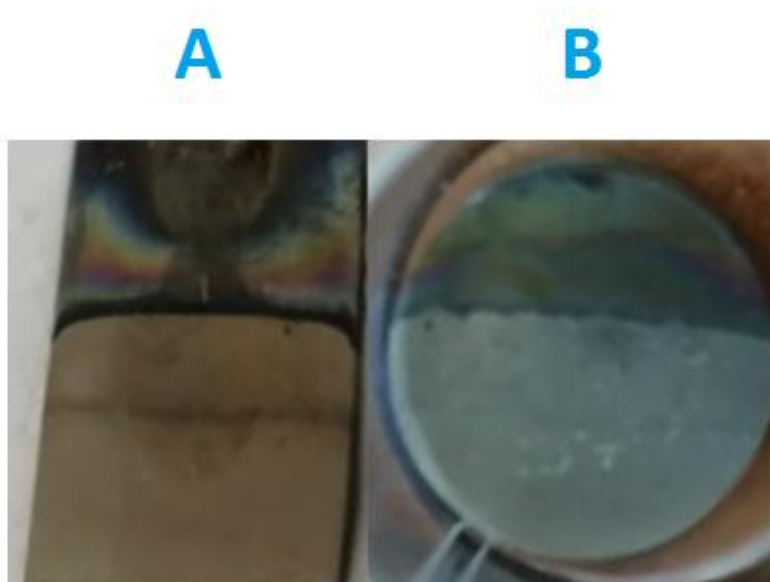


Figura 4.6 Muestras de a) titano y b) TiNi cargadas con MTX.

4.5 Estudio de la liberación “in vitro” del fármaco metotrexato

Para abordar las limitaciones de la administración tradicional de medicamentos, los nanotubos (NT) son reconocidos como un sistema de liberación prometedor para la administración local de fármacos. Debido a las excelentes propiedades de biocompatibilidad y fisicoquímicas, los nanotubos de titanio, crecidos mediante un proceso de anodizado electroquímico, se han utilizado para fabricar nuevos implantes cargados de fármacos para su administración localizada [7].

En este proyecto, se estudiaron los perfiles de liberación del fármaco metotrexato al 1% (p/v) en agua desionizada para la aleación anodizada de TiNi y Ti puro (a 50 Volts y 2hr).

En la figura 4.7, se encuentran graficados los perfiles de liberación en tiempo de 1hr para las muestras anodizadas a 50V cargadas con MTX. Se puede observar en los primeros tres puntos que hay un mayor volumen de liberación respecto a los demás puntos ya que es el comportamiento liberación inicial (durante los primeros 15 minutos) y posterior a esta liberación existe una liberación sostenida, hasta llegar a los 60 min.

La rápida liberación inicial se puede atribuir a la liberación de moléculas de fármaco que están adsorbidas sobre la superficie de los nanotubos. Esta etapa de liberación es muy rápida debido al alto gradiente de concentración entre los nanotubos y el medio circundante [12,19].

También se puede observar que el comportamiento de liberación del fármaco en ambas muestras es muy parecido y constante. Es importante notar el pequeño tamaño de las barras de error, dado que representan la reproducibilidad del experimento.

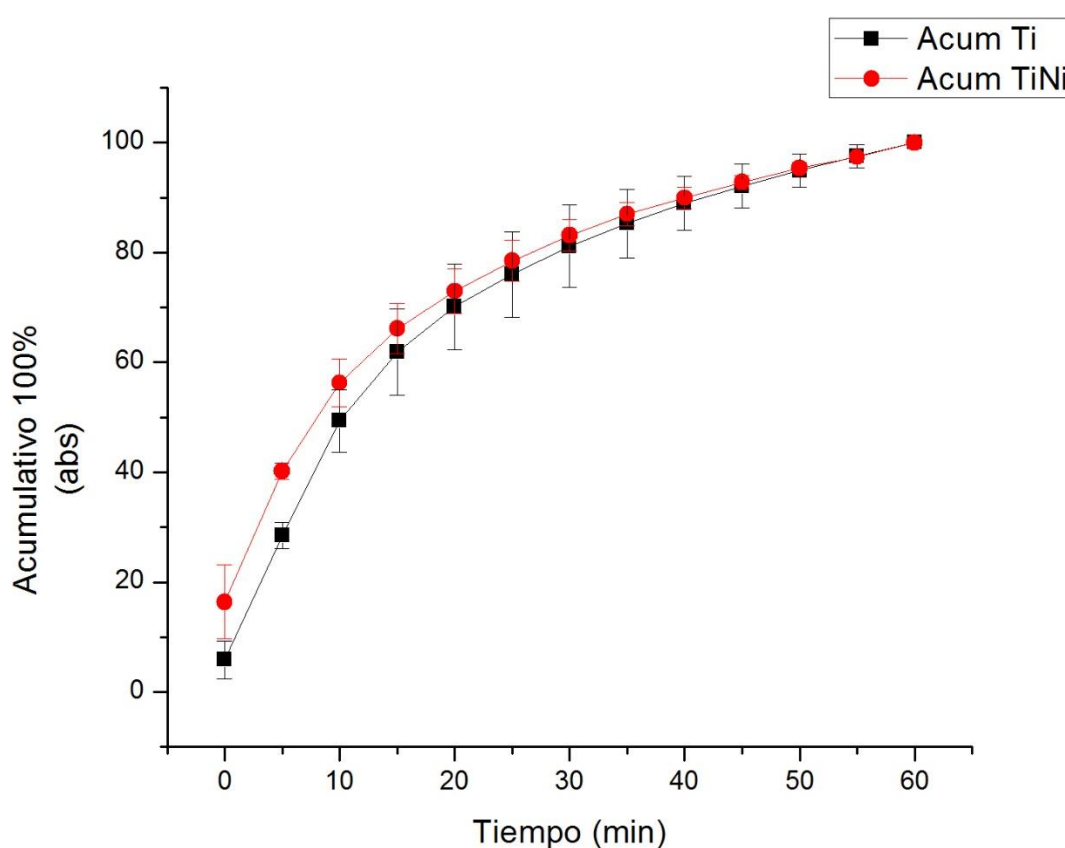


Figura 4.7 Perfil de liberación in vitro del fármaco metotrexato en 1 hr a partir de aleación TiNi y Ti puro anodizada a 50V.

En la figura 4.8, se encuentran graficados los perfiles de liberación a un tiempo de 1 día para las muestras anodizada a 50V y cargadas con MTX. En este caso, es más fácil poder apreciar el caso de liberación inicial de 60 minutos y una liberación lenta y linealmente constante

hasta llegar a las 24 horas de liberación. Cabe resaltar que en caso de las muestras de titanio el cambio de una fase de liberación rápida inicial a una fase de liberación controlada fue más abrupta, como se puede observar en el tiempo de 200 min, las muestras de TiNi, presentan un cambio más suave mediante una curvatura, hasta llegar a una línea horizontal de liberación constante.

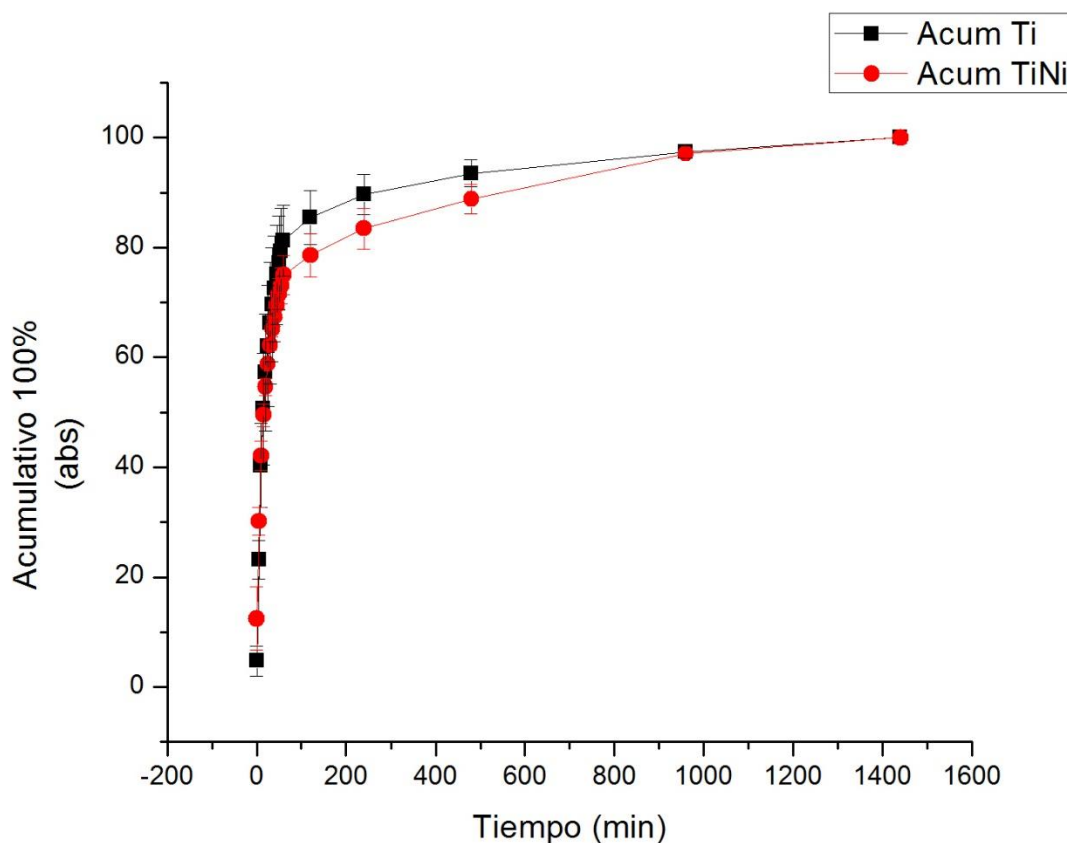


Figura. 4.8 Perfil de liberación in vitro del fármaco metotrexato en 1 día a partir de aleación TiNi y Ti puro anodizada a 50V.

En la figura 5.9, se encuentran graficados los perfiles de liberación, en este caso, para un tiempo de 15 días. Las muestras anodizadas a 50V por dos horas. Los resultados muestran una liberación inicial durante los primeros 60 minutos, seguido de una liberación lenta del resto del fármaco, a su vez controlada y constante como en los anteriores perfiles de liberación.

Las barras de error son menores para el Ti comparado con TiNi, esto se puede atribuir a que la morfología de la aleación no es tan uniforme ya que cuenta con formación de canales, que, aunque es posible depositar mayor cantidad de fármaco, hace que haya un mayor margen de error al repetir el experimento.

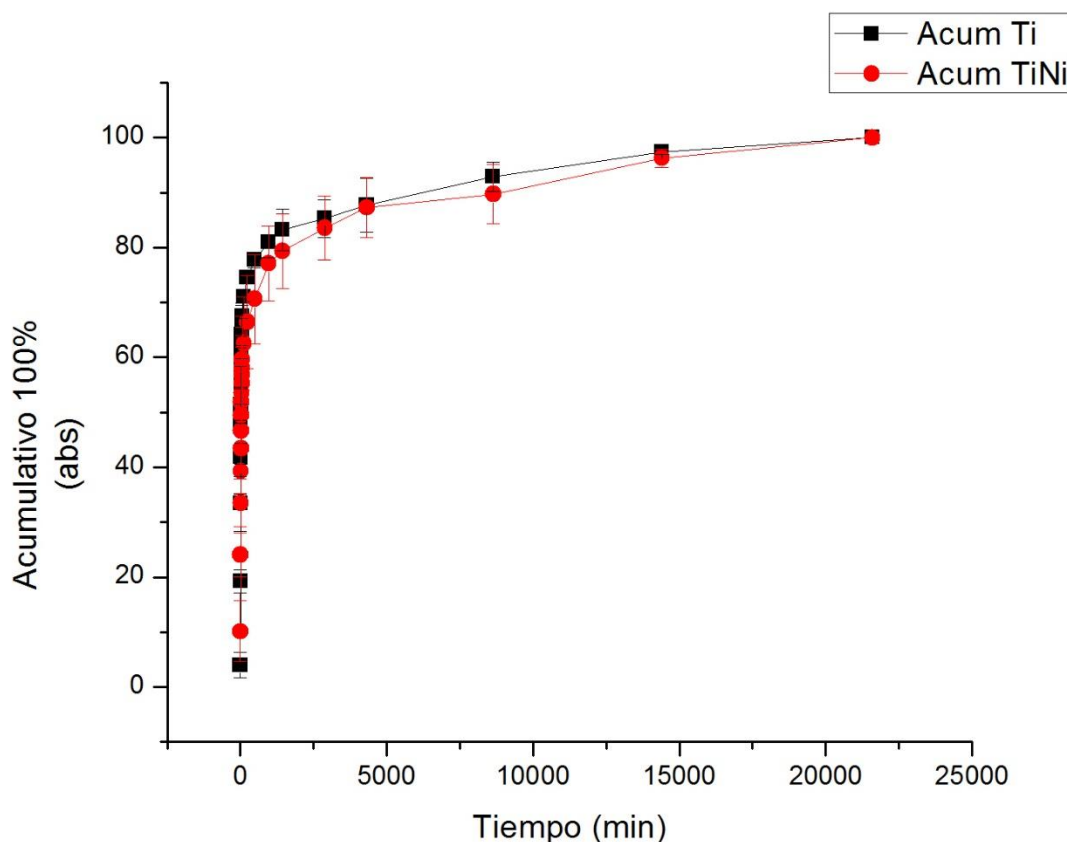


Figura 4.9 Perfiles de liberación in vitro del fármaco metotrexato en 15 días a partir de aleación TiNi y Ti puro anodizada a 50V.

En la figura 4.10, se encuentran graficados los perfiles de liberación a 30 días, este fue el tiempo máximo. En la figura se observa, en ambos sistemas de liberación controlados y constantes con mínimas variables entre ellas, un factor importante de mencionar es que las muestras de TiNi siempre presentaron una menor liberación en comparación de las de titanio y siempre se mantuvo una liberación controlada.

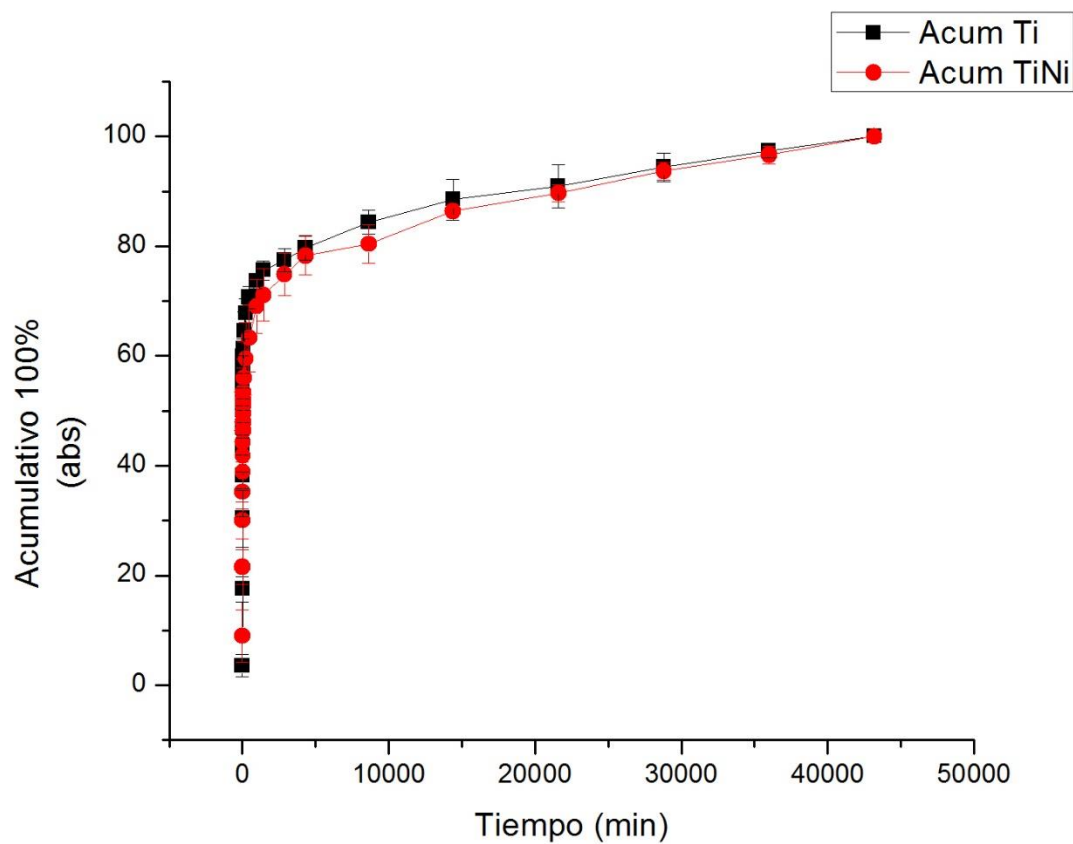


Figura 4.10 Perfil de liberación in vitro del fármaco metotrexato en 30 días a partir de aleación TiNi y Ti puro anodizada a 50V.

4.6 Análisis morfológico de nanofibras de PNIPAM/PVA

El segundo punto importante en esta experimentación de sistema de liberación de fármaco está conformado por la parte orgánica del sistema que consiste en una matriz polimérica sintetizadas por la técnica de electro hilado, dando como resultado nanofibras. Estas nanofibras cuentan con la ventaja del parecido morfológico con la matriz extracelular, lo que provoca una mejor aceptación en el cuerpo [9].

Se analizaron las nanofibras de PVA/PNIPAM por medio de SEM en donde se pudo observar una morfología fibrosa de tamaño nanométrico (150-300nm) con pocos defectos. Como se puede apreciar en la figura 4.11.

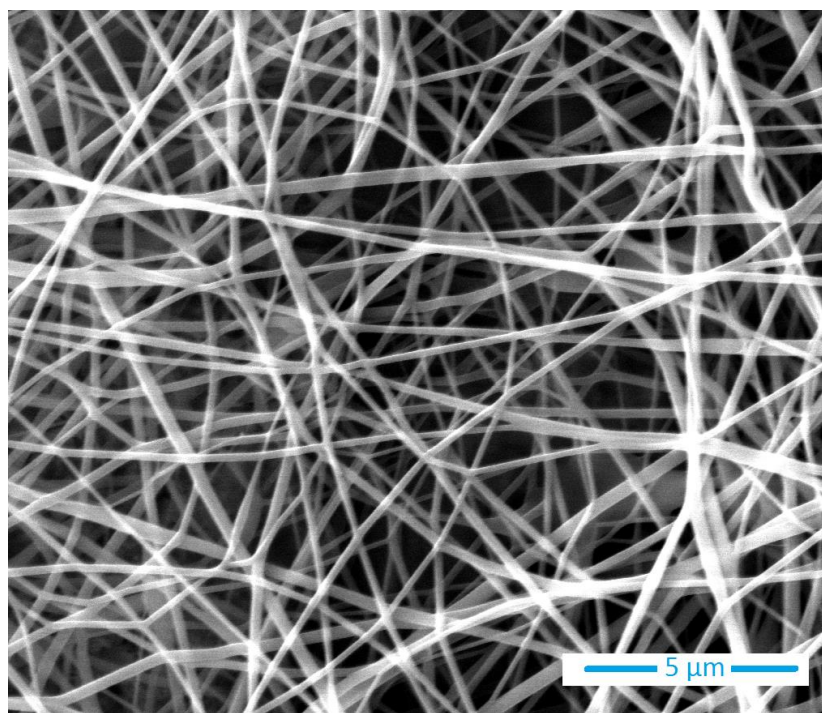


Figura 4.11 Nanofibras conformadas PVA/PNIPAM

Teniendo en cuenta la formación de las nanofibras se manipularon las condiciones de electrohilado (voltaje, tiempo y distancia entre fuente y colector) para tener nanofibras de un diámetro óptimo y así poder utilizarlos como medio que module la liberación del fármaco dando paso al sistema de liberación deseado. Se usaron dos medidas de voltaje: 20KV y 25KV, a una distancia de 10cm de fuente a colector. Dando como resultados morfológicas de

nanofibras de diámetros de 90-150nm y 170-250nm, respectivamente, como se muestran la figura 4.12.

Se tomaron en cuenta los resultados de las fibras de 25KV, ya que esos tamaños de 175-250nm, se asemejan al diámetro de los nanotubos. Cabe resaltar que se realizaron electrohilados con voltajes menores a 20KV, pero se obtuvieron morfologías deformes y con muchos defectos, o se obtenían morfologías de una fibra sino más bien como una película, a su vez se realizaron mediciones superiores a 25KV y las fibras presentaban un diámetro muy grande, no lograron formarse la fibra debido a la gran cantidad de corriente y dando el efecto de electrospray generando una plasta de polímero en el colector [9,10].

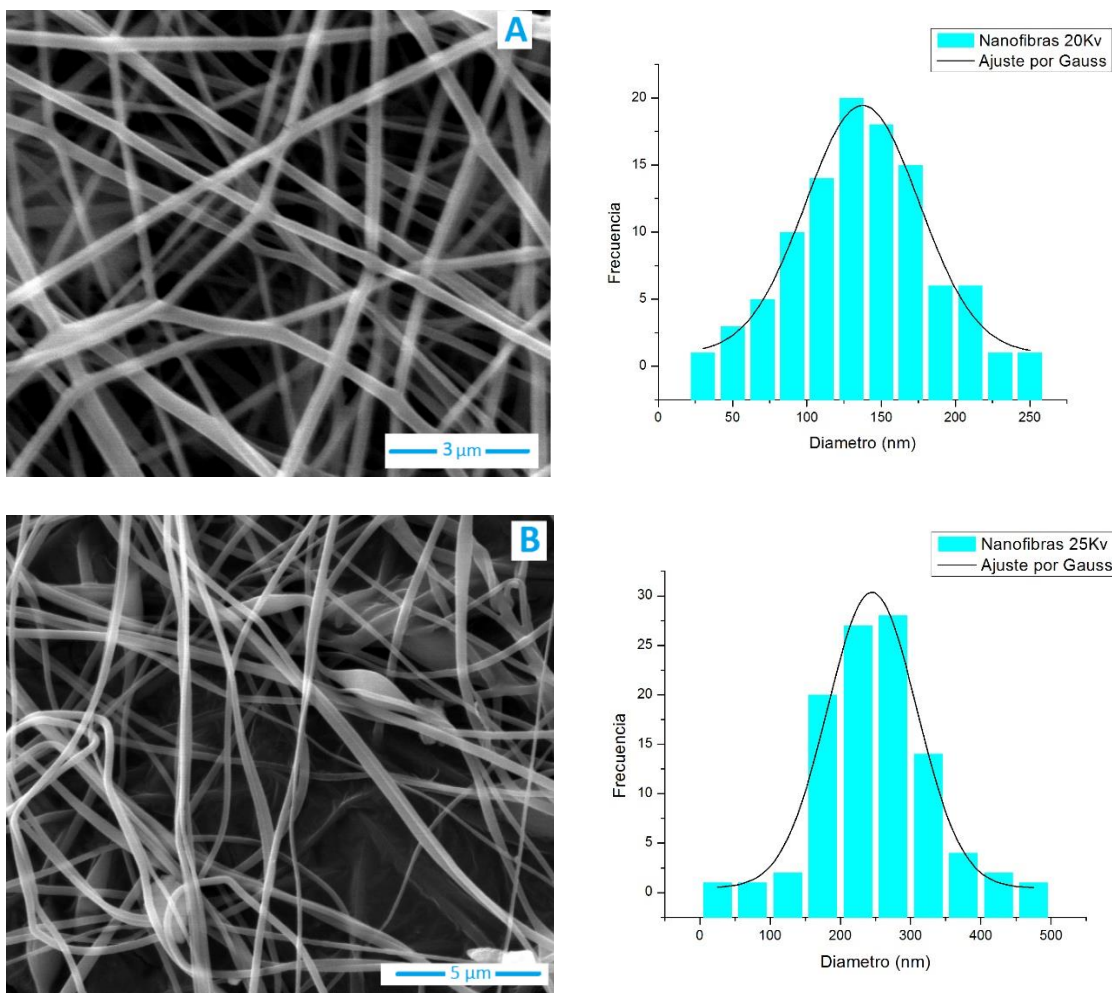


Figura 4.12 Nano fibras a 20KV A), 25KV B) y sus distribuciones de tamaño respectivamente.

4.7 Electrohilado sobre nanotubos

Los sistemas de liberación de medicamento, así como de elementos terapéuticos al cuerpo siempre han tenido ciertos problemas una vez que se requieren aplicar en prótesis o stents, al querer integrarse al cuerpo debido a que este tipo de sistemas generalmente son reconocidos por el sistema inmune como un agente externo y dañino para el cuerpo [11].

Uno de los problemas que presentan los sistemas de liberación son el descontrol inicial de los primeros minutos como se pudo observar en las liberaciones de nanotubos en esta investigación, este fenómeno es llamado “*burst release*” [12-14]. Teniendo en cuenta las previas investigaciones, nuestro grupo de trabajo propone como un método de control de la liberación, el uso de nanofibras poliméricas electrohiladas directamente sobre las muestras que presentan una superficie homogénea de nanotubos. De esta manera se creará una barrera difusiva que impedirá la liberación de manera inmediata de la carga fármaco hacia el medio de reacción.

En un primer ensayo se utilizó un colector de aluminio para los parámetros de las nanofibras, el siguiente paso fue depositar directamente sin el colector de aluminio, en las muestras anodizadas de Ti y TiNi, formando el sistema de liberación conformado por dos fases estructurales diferentes teniendo una orgánica (nanofibras poliméricas PVA/PNIPAM) y una inorgánica (nanotubos Ti y TiNi).

En la figura 4.13, se puede observar la morfología de la muestra correspondiente a un proceso de electrohilado a 25V durante una hora, sobre una superficie de nanotubos de aleación de TiNi Fig 4.13 A) y Ti Fig 4.13 B). En el análisis de la morfología de las dos fases que participan en este trabajo, se puede observar que la fase de las nanofibras presentaba una morfología mínima de defectos, esto ayuda a tener una red parecida a la matriz extracelular anteriormente mencionada y tener un sistema encapsulado para su liberación de fármacos. Otro punto importante fue que las nanofibras siguieron teniendo presentes el tamaño de diámetro constante respecto con el uso de colector de aluminio, cabe resaltar que es fácil su replicación y conserva morfologías de nanofibras de 200nm aproximadamente por fibras óptimas para esta investigación [15-18].

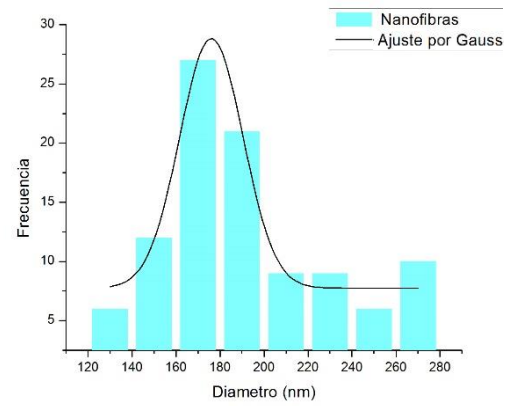
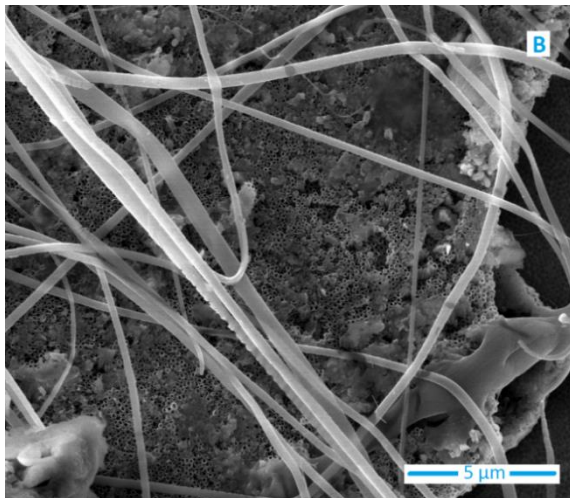
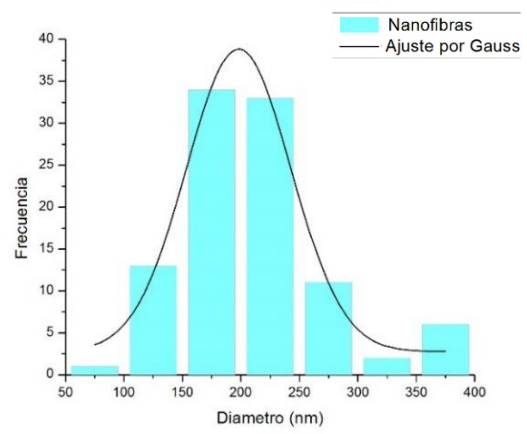
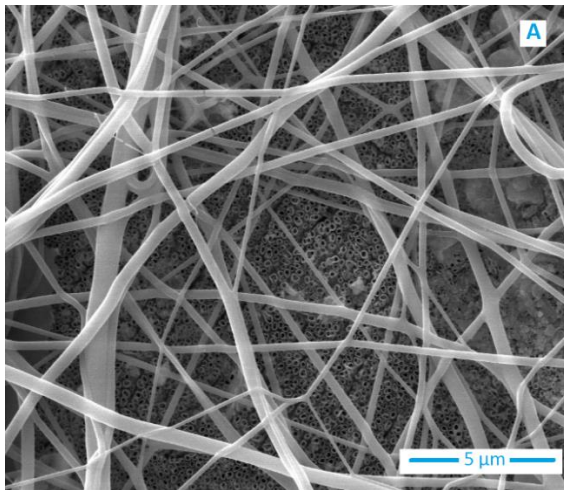


Figura 4.13 Nanofibras sobre nanotubos dos fases contiguas, A) nanofibras-TiNi, B) nanofibras-titanio y distribución de tamaños de nanofibras depositadas.

4.8 Estudio de la liberación “in vitro” del fármaco metotrexato, en titanio y aleaciones anodizadas TiNi, encapsulado con nanofibras PVA/PNIPAM

Tomando en cuenta los resultados obtenidos del sistema de liberación Nanotubos-Metotrexato se realizó la liberación de MTX mediante el encapsulamiento en los nanotubos y modulada por una membrana polimérica (PVA/PNIPAM) con una capa de nanofibras (Nanotubos-MTX-Nanofibras). Utilizando las ventajas que nos brinda las nanofibras como controlador de la liberación del MTX encapsulado en los nanotubos de Ti.

En la figura 4.14, se encuentran graficados los perfiles de liberación a una hora de las muestras anodizada a 50V y cargadas con MTX, con una capa de nanofibras de una hora de electrohilado. Se puede observar una homogeneidad entre las distancias de cada punto, causando una liberación controlada del fármaco disminuyendo la liberación espontanea en ambas muestras respecto a los sistemas sin el recubrimiento polimérico, la muestra de TiNi nanofibras (TNH) presenta una liberación menor en volumen total de liberación a comparación de la muestra de Ti-nanofibras (TH) esto se aprecia en la gráfica ya que el ensayo liberación de TNH siempre permanece debajo del ensayo de liberación TH.

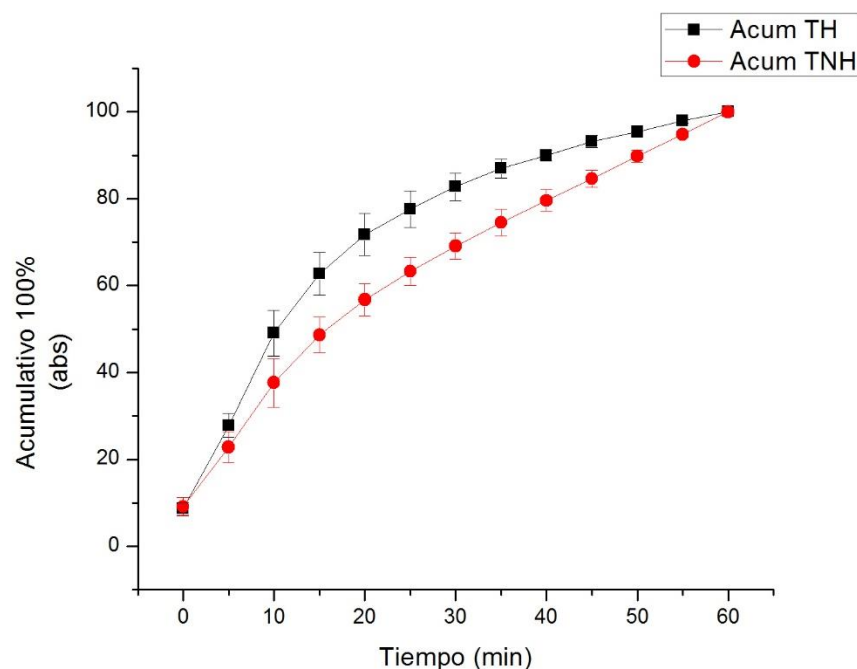


Figura 4.14 Perfiles de liberación in vitro del fármaco metotrexato en 60 minutos a partir de aleación TiNi, Ti puro anodizada a 50V y membrana nanofibrosa.

En la siguiente figura 4.15 se encuentran graficados los perfiles de liberación a 1 día de las muestras anodizada a 50 V y cargadas con MTX, con una capa de nanofibras de una hora de electrohilado. Se puede observar que el sistema se estabiliza a partir de 2 horas de haber empezado dicho ensayo, siendo muy parecidas en cuestión de repetividad de experimento ya que sus márgenes de error son muy pequeños pero se puede observar que la muestra electrohilada TH presenta una menor cantidad de liberación. En el caso del sistema TNH su liberación inicial es mayor, esto se le puede atribuir a que la aleación TiNi posee no solo nanotubos en su superficie, sino también, una serie “caminos” donde se podría depositar el fármaco, dichos “caminos” representarían un mayor volumen de liberación, dado que no tienen un diámetro específico que controle su salida, resultando en la mayor cantidad de fármaco inicial.

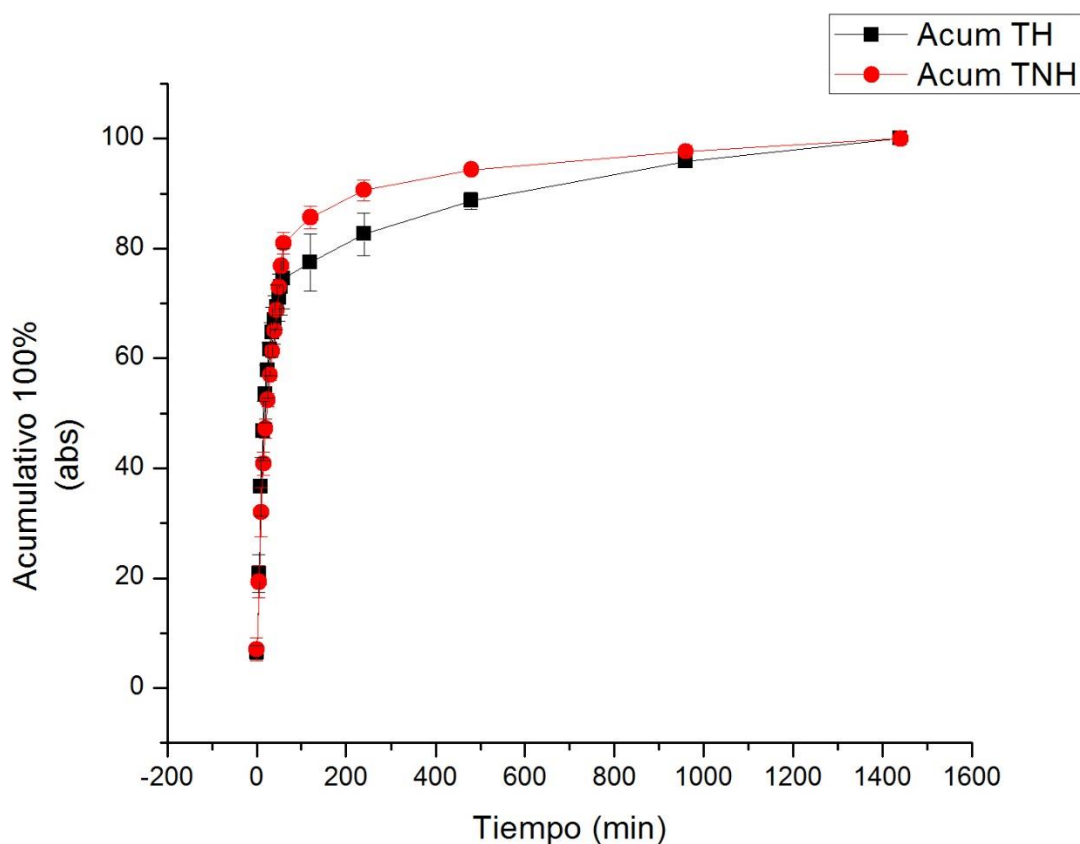


Figura 4.15 Perfiles de liberación in vitro del fármaco metotrexato en 1 día a partir de aleación TiNi y Ti puro anodizada a 50V en una matriz nanofibrosa.

En la siguiente figura 4.16, se encuentran graficados los perfiles de liberación a 15 días de las muestras anodizada de a 50 V y cargadas de MTX, con una capa de nanofibras de una hora de electrohilado. En esta ocasión es evidente el cambio entre los ensayos de liberación, el ensayo TNH representa una liberación constante y llega más rápido al cien por ciento de la liberación inicial y después sigue constante a lo largo de los puntos correspondientes (8640 min en adelante), en el caso de ensayo de liberación de TH en un inicio libera menos fármaco y además en los últimos días presenta una liberación no homogénea, esto último puede deberse a la degradación de la membrana nanofibrosa, en ambos ensayos de liberación presentan un bajo porcentaje de margen de error.

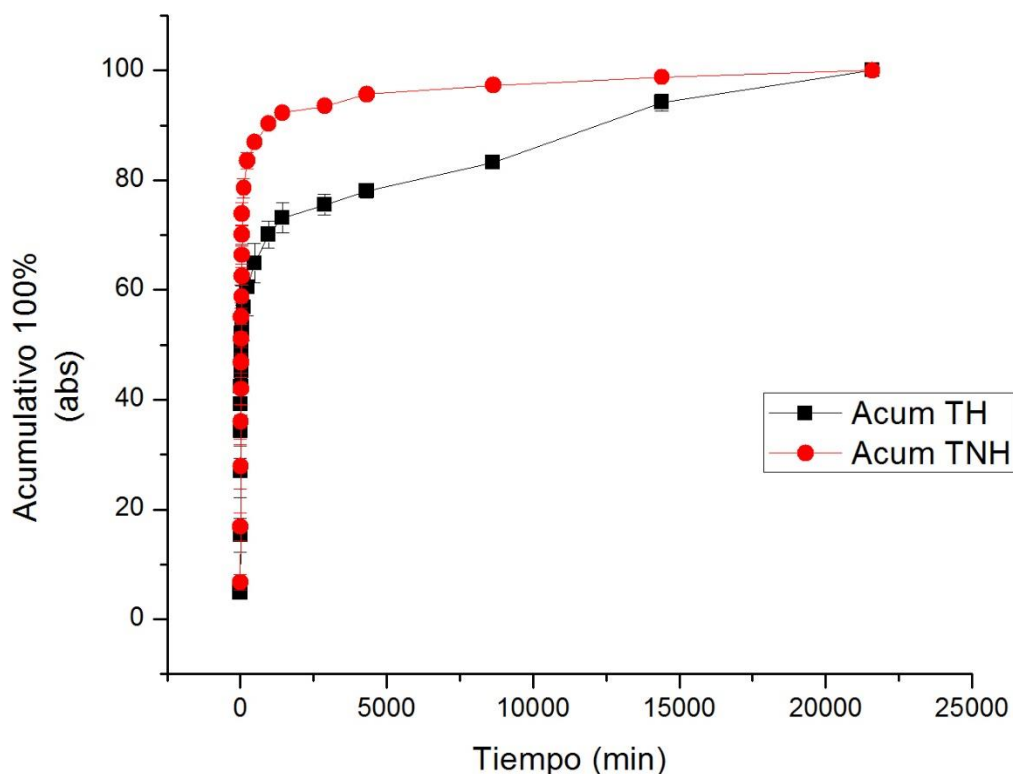


Figura 4.16 Perfiles de liberación in vitro del fármaco metotrexato en 15 días a partir de aleación TiNi y Ti puro anodizada a 50V en una matriz nanofibrosa.

Por ultimo en este apartado de liberacion de 30 días controlada con nanofibras se presenta graficados los perfiles de liberación de las muestras anodizada a 50V, con una capa de nanofibras de una hora de electro-hilado como se muestra en la figura 4.17. En este último ensayo de nanofibras se observó la desigualdad entre la cantidad de volumen liberado de MTX, el ensayo de liberación controlado TNH presentó un mejor control de liberación, aunado que la liberación inicial desprende su mayor volumen de fármaco y llega a una estabilización temprana y permanece constante a lo largo de todo la experimentación a comparación de ensayo de TH que libera un volumen menor en la etapa inicial pero a la largo de los demás tiempos genera mayores volúmenes de fármaco, ambos presentaron márgenes de errores mínimos, también, un punto importante es que ambos perfiles presentan un aumento de porcentaje en los últimos 10 días de su liberación, eso puede deberse a la degradación de la misma fibra causando deformación en la morfología de los nanotubos y generando mayor volumen de liberación como se observa al final de los picos ascendentes que presentan las dos gráficas. Las diferencias que presentan estos sistemas pueden atribuirse a los factores de dimensiones de la placa de titanio y el diámetro de titanio-níquel, influyendo en la depositacion de las nanofibras en su superficie, causando diferentes deterioros en la matriz polimérica. En el caso del TNH el níquel debido a su electronegatividad podría ser un buen anclaje en la conservación de las nanofibras y prolongando su tiempo de vida. Otro punto podría ser la cantidad presente del PNIPAM en las nanofibras, mostrando la propiedad hidrofílica en las muestras de titanio, debido a la absorción del PBS y temperatura, causando hinchazón en la fibra y porosidad o contracción por la repulsión del medio, que con el tiempo se presentaría una difusión térmica que llegaría a un equilibrio en la membrana, haciendo pasar la solución hasta los nanotubos cargados provocando la liberación [22].

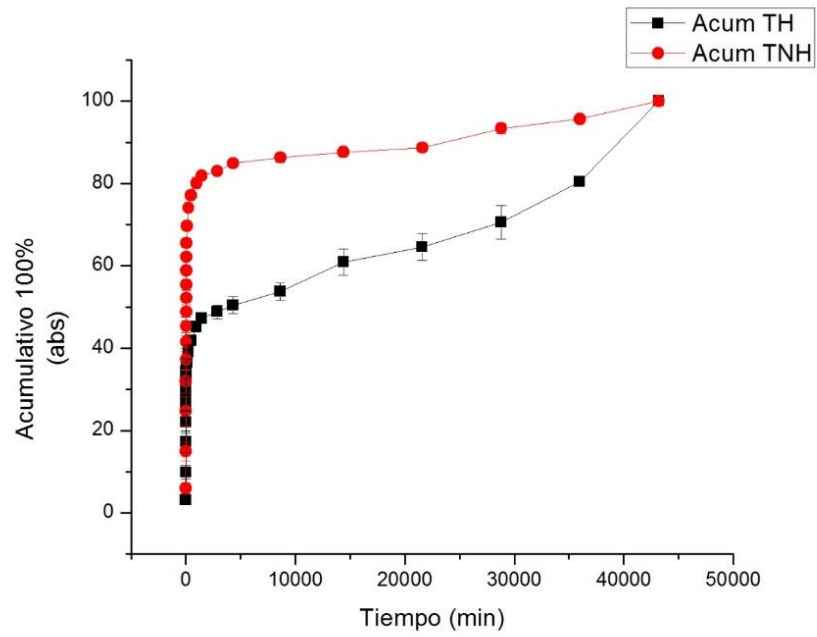


Figura 4.17 Perfiles de liberación in vitro del fármaco metotrexato en 30 días a partir de aleación TiNi y Ti puro anodizada a 50V en una matriz nanofibrosa.

4.9 Película polimérica (PVA/PNIPAM)

El uso de películas ha sido realizado como el sistema de liberación convencional cuando se trata de recubrimientos de prótesis, teniendo un acabado más uniforme y dándole al material propiedades que no presentaría si no tuviera ese recubrimiento, como; resistencia a la corrosión, biocompatibilidad, porosidad controlable, etc... [20,21]. Teniendo en cuenta lo anterior se optó por realizar una película que servirá como otro medio encapsulante del fármaco y como modulador su liberación.

En esta sección se aborda una variante en el manejo de la solución polimérica, utilizada para generar nanofibras en este trabajo. La solución de PVA/PNIPAM fue depositada en las muestras utilizando la técnica de evaporación de solventes, se cubrió toda la muestra y se dejó secar durante 3 días hasta que se evaporara el solvente como consecuencia creo la película polimérica sobre los nanotubos, la finalidad de la película es modular la liberación del fármaco, lo que en la sección anterior hicieron las nanofibras, esto con la intención de encontrar un sistema óptimo.

De igual manera que en el uso de las nanofibras como sistemas de liberación, la película polimérica hizo mejoras en los perfiles de liberación mediante la prolongación de la difusión de fármaco en periodos de tiempos largos, disminución de la liberación inicial y control de cantidad de fármaco uniforme. En la siguiente figura 4.18 se puede apreciar las muestras de Ti y TiNi anodizadas y cargadas con MTX, pero esta vez con la película polimérica.

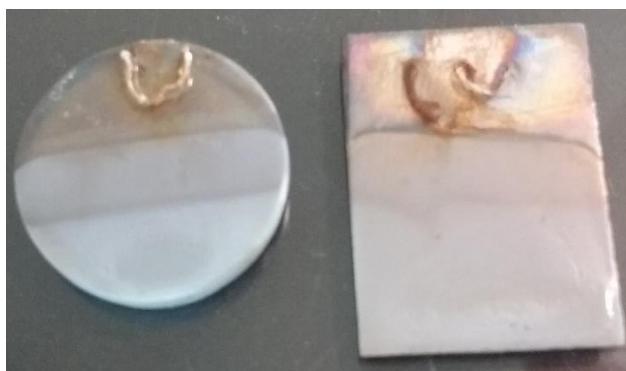


Figura 4.18 Muestras recubiertas con la película polimérica de PVA/PNIPAM.

4.10 Estudio de la liberación “in vitro” del fármaco metotrexato encapsulado en nanotubos de titanio y aleaciones anodizadas TiNi modulado mediante una película PVA/PNIPAM

Teniendo las muestras con la película polimérica se llevó acabo el tercer ensayo de liberación de este proyecto (Nanotubos-MTX-Película), realizando los perfiles de liberaciones con los mismos parámetros de los ensayos anteriormente mencionados, para poder realizar una comparativa de perfiles de liberación y obtener el perfil óptimo.

En la figura 4.19, se encuentran graficados los perfiles de liberación de las muestras anodizada a 50V con una película polimérica en un tiempo de liberación de 60min. Las muestras presentaron una liberación inicial que comenzó a estabilizarse a la mitad del experimento, pero solo sucedió en la muestra de Titanio (TP), la cual presento una liberación inicial repentina, y una estabilización constante en los siguientes 30 minutos. En el caso de la muestra TNP presento una serie de desigualdades de liberación después del burst release (20 min), causando escalonamientos en la gráfica que denotan un descontrol en la cantidad de liberación de fármaco y teniendo unas barras de error muy marcadas, teniendo un sistema poco replicable.

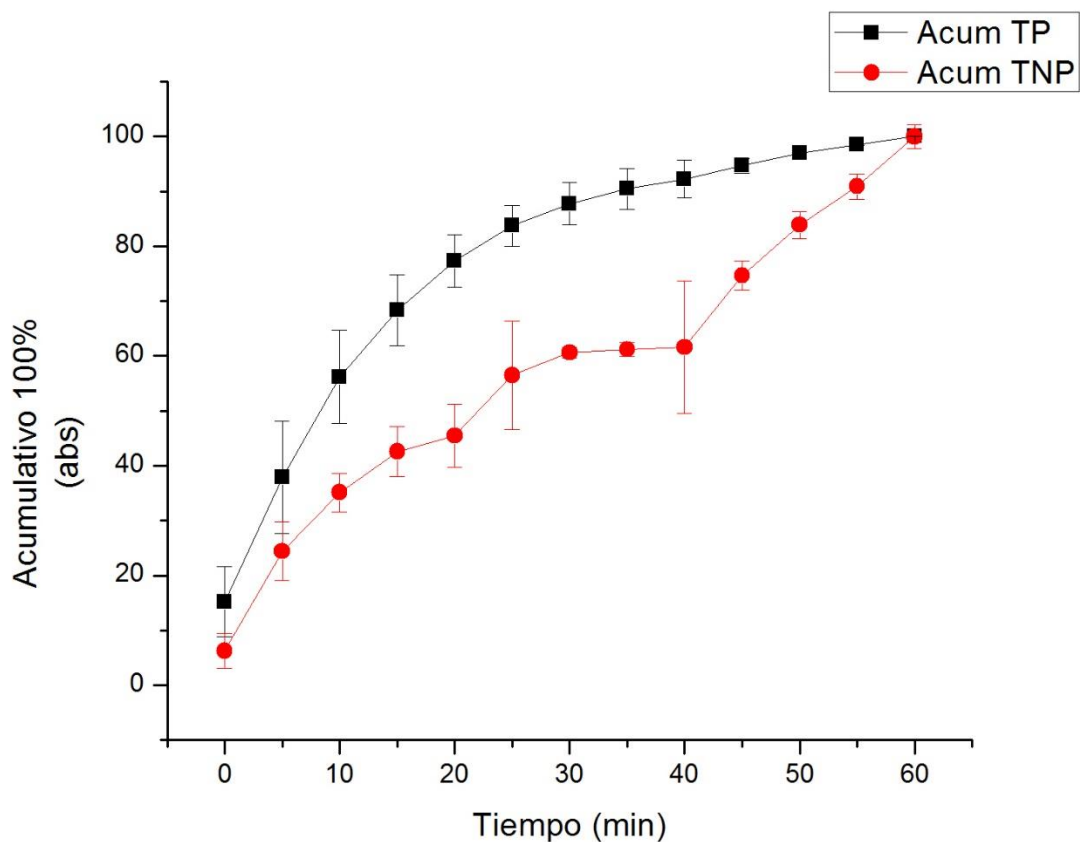


Figura 4.19 Perfiles de liberación in vitro del fármaco metotrexato a partir de aleación TiNi y Ti puro anodizada a 50V en una película polimérica (PVA/PNIPAM) en 60 minutos.

En la figura 4.20, se encuentran graficados los perfiles de liberación de las muestras anodizada de 50V con una película polimérica en un tiempo de liberación de 1 día. En ambos casos, los de perfiles de liberación en los primeros minutos tienen un mayor volumen de liberación y logra estabilizarse a lo largo de 2 horas, aunque el sistema TP cuenta con una serie de tiempos de mayor volumen liberado y también se presentan barras de error muy marcadas en ambos perfiles de liberación.

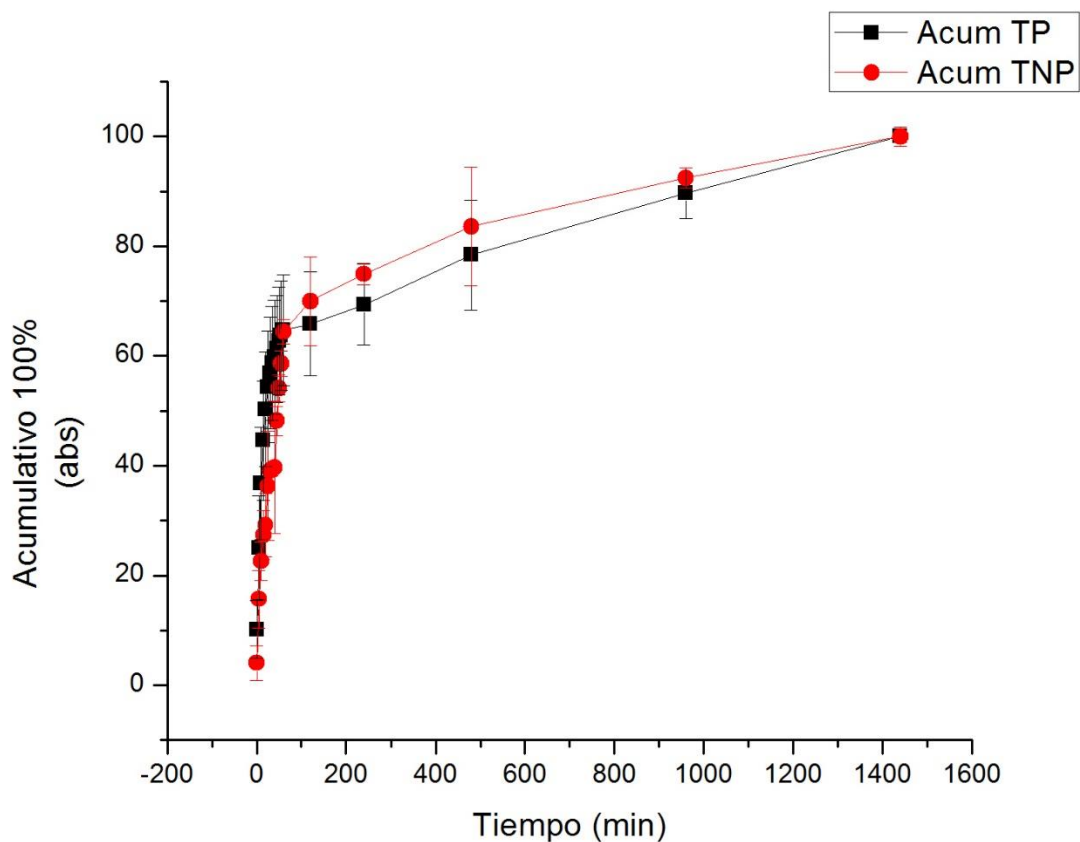


Figura 4.20 Perfiles de liberación in vitro del fármaco metotrexato a partir de aleación TiNi y Ti puro anodizada a 50V en una película polimérica (PVA/PNIPAM) en 1 día.

En la figura 4.21, se encuentran graficados los perfiles de liberación de las muestras anodizada de 50V con una película polimérica en un tiempo de liberación de 15 días. Ambas muestras presentan tres fases de liberación a diferencia de los anteriores casos que solo presentaban dos, aquí se tiene una liberación inicial con mucho volumen inicial del fármaco, luego se presenta una posible estabilización de fármaco liberado pero al minuto 5000 de liberación en adelante se presenta otra fuerte cantidad de volumen liberado mayor o igual a la liberación inicial, a su vez, siguen presentando barras de error muy elevadas, esto puede atribuirse a la degradación de la película polimérica.

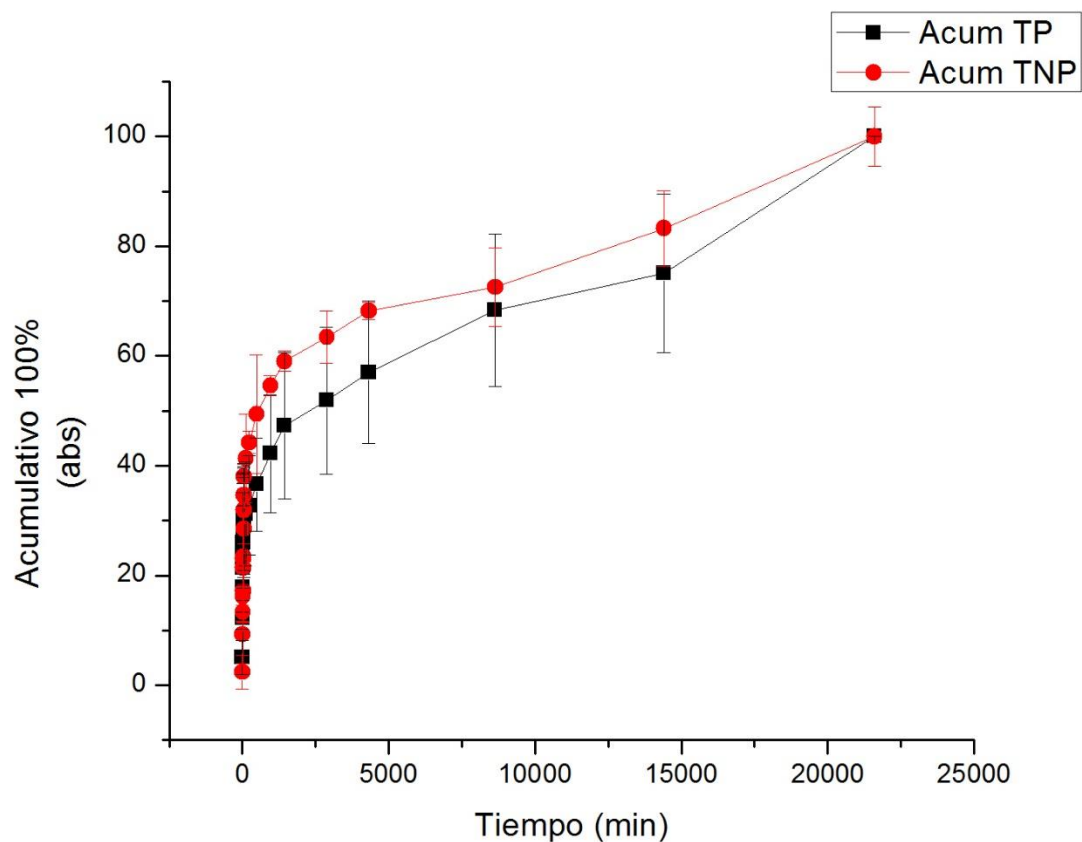


Figura 4.21 Perfiles de liberación in vitro del fármaco metotrexato a partir de aleación TiNi y Ti puro anodizada a 50V en una película polimérica (PVA/PNIPAM) en 15 días.

En la figura 4.22, se encuentran graficados los perfiles de liberación de las muestras anodizada de 50V con una película polimérica en un tiempo de liberación de 30 días. Es más marcado la liberación de tres fases dando liberaciones irregular y volúmenes de mayor presencia de fármaco, a su vez, a partir del décimo día (minuto 14400) se observa que en ambos casos se tiene mayor liberación a una proporción de la inicial y de la mitad del proyecto se libera el 80% de todo el volumen y vuelve a presentarse las amplias barras de error [23].

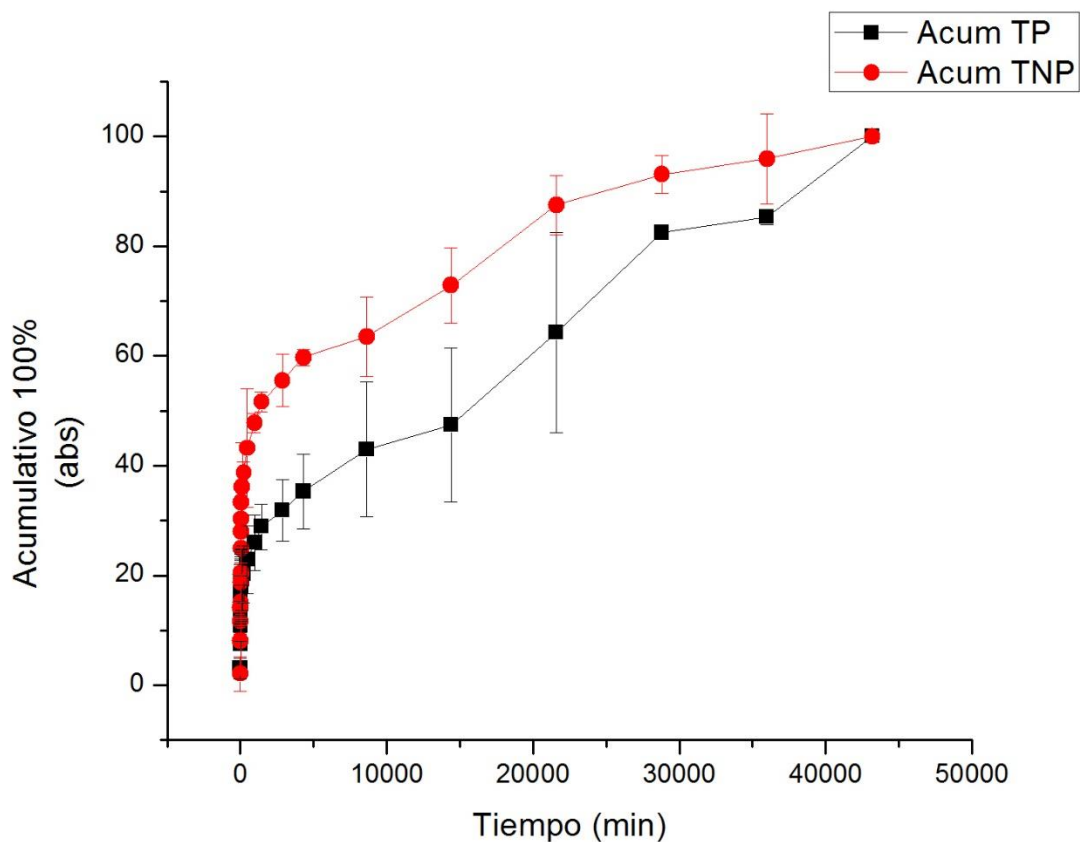


Figura 4.22 Perfiles de liberación in vitro del fármaco metotrexato a partir de aleación TiNi y Ti puro anodizada a 50V en una película polimérica (PVA/PNIPAM) en 30 días.

4.11 Liberación óptima de muestras

En este apartado se presentan la comparativa de los seis sistemas de liberación realizados en dos imágenes, en un inicio en el lado izquierdo los sistemas de titanio con sus tres sistemas nanotubos-nanofibras-películas y a su vez del lado derecho los sistemas de titanio-níquel con sus tres sistemas nanotubos-nanofibras-películas con sus respectivos tiempos 60 min, 1 día, 15 días y 30 días.

En la comparación del Ti y TiNi con sus tres respectivos sistemas de liberación (nanotubos-nanofibras-película) en tiempos de 60 minutos como se observa en la figura 4.23, podemos observar que los perfiles de liberación de Ti recubiertas con la película polimérica presentan

una liberación un poco más rápida a comparación de los otros dos sistemas, ya que son la que llegan más rápido a su liberación total. Contrario a lo que se podría esperar, dado que la película es para modular esta liberación, sin embargo, esta etapa de la liberación “burst realese” como se explicó anteriormente, es más bien caótica y responde a la liberación del fármaco adsorbido en la superficie. En esta misma etapa, no es tanto el cambio respecto al uso de las nanofibras o el uso de solo nanotubos en ambos sistemas (Ti y TH), es decir, tienen una liberación parecida solo que el sistema TH en sus barras de error son más pequeñas, a comparación de los sistemas TP que son las que tienen barras de error más pronunciadas. Por otro lado, las muestras de TiNi presentan variantes de liberación entre ellas, las muestras Nanotubos-MTX (TiNi) son las que tienen una liberación inicial más pronta al llegar más rápido a su 100% de liberación, los sistemas TNH presentan liberación más lenta pero constante ya que su liberación inicial está controlada por las nanofibras, generando cantidades iguales de liberación de fármaco que se mantienen a lo largo del ensayo, el sistema TNP es el único sistema que no mantiene una liberación constante ni replicable, se puede observar escalonamientos de volumen de fármaco a lo largo de toda su liberación siendo ese el causante de su excesiva liberación y a su vez sus barras de error muy remarcadas. Es evidente que las muestras en ambos casos (Ti-TiNi) que presentan solo nanotubos y nanofibras realizan un buen trabajo de liberación controlada y prolongada, pero cabe resaltar que las nanofibras muestran una mejora en su liberación retardando el flujo de liberación, haciéndolo constante y se obtiene una mayor efectividad de replicación en los sistemas de liberación, observable en sus barras de error muy pequeñas.

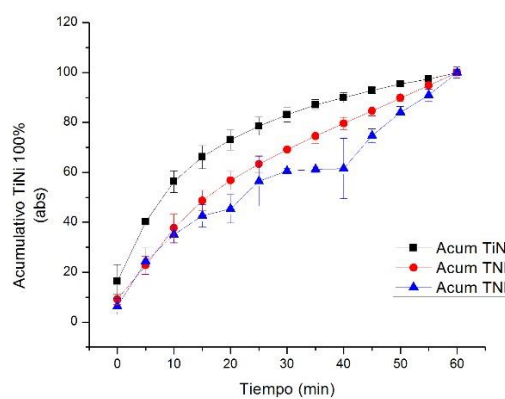
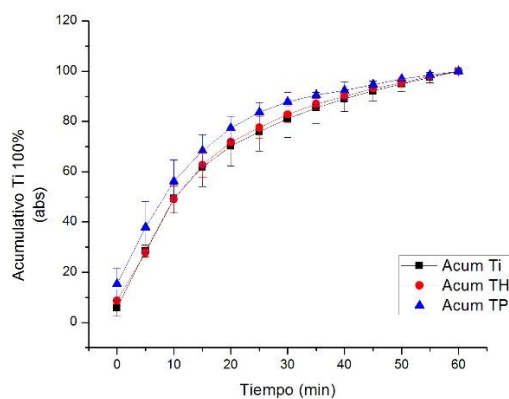


Figura 4.23 Comparación de sistemas de liberación Ti y TiNi, Nanotubos-MTX, Nanotubos-MTX-Nanofibras y Nanotubos-MTX-Película en un tiempo de 60 min.

La comparación del Ti y TiNi con sus tres respectivos sistemas de liberación esta vez en un tiempo de un día se observa en la figura 4.24. Ahora se nos presenta que las muestras conformadas con Titanio, en el caso de solo los nanotubos (Ti) se sitúan a la cabeza en esta comparación de estos tres sistemas, dando una liberación inicial de casi todo su volumen total en las primeras horas y llegando a una estabilización a lo largo del todo el ensayo, las muestras TH tuvieron un efecto parecido a las Ti pero teniendo como ventaja una menor liberación inicial y unas barras de error más pequeñas, todo lo contrario a las muestras TP que si bien presentan una liberación inicial menor pero también presentan una liberación total de volumen mayor y no son constantes y tampoco replicables ya que siguen teniendo escalonamientos y barras de error muy marcadas. En el caso de las muestras de TiNi a comparación de la anterior, las muestras hiladas TNH se posicionaron a la cabeza al tener una liberación inicial más rápida generando una liberación constante, controlada y replicable como se venía diciendo desde la gráfica anterior, el ensayo de nanotubos (TiNi) es muy parecido a la liberación de TNH solo con un volumen menor de liberación total de fármaco, en cambio las muestras TNP presentan una mayor cantidad de volumen total del fármaco liberado y barras de error marcadas. Si bien ya se venía mencionando desde los ensayos anteriores, los nanotubos son buenos sistemas de liberación, las muestras de solo nanotubos presentan en si una buena liberación, pero con el uso de las nanofibras, esa buena liberación es mejorada ya que reduce la liberación inicial y también sus barras de error disminuyen, por parte de las muestras de titanio-níquel las nanofibras favorecen la liberación al igual que en el titanio y las películas desfavorecen los sistemas en ambos casos, teniendo grandes barras de error y escalonamientos de volúmenes de fármaco.

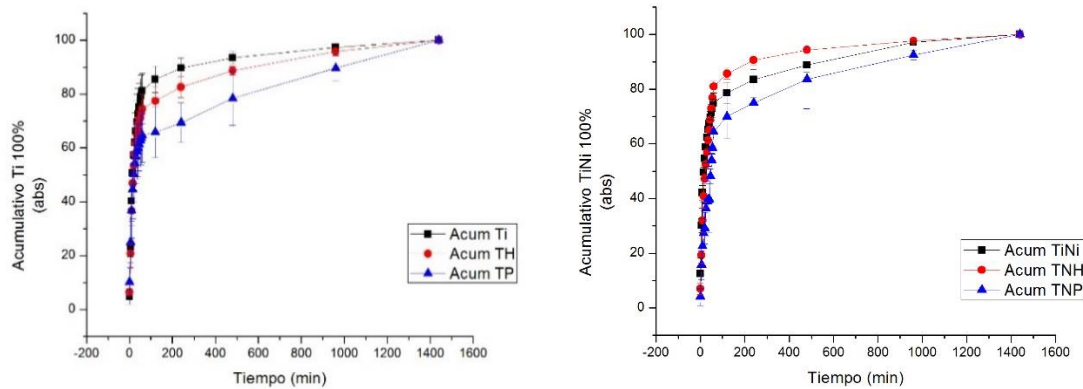


Figura 4.24 Comparación de sistemas de liberación Ti y TiNi, Nanotubos-MTX, Nanotubos-MTX-Nanofibras y Nanotubos-MTX-Película en un tiempo de 1 día.

Se muestran la comparación del Ti y TiNi con sus tres respectivos sistemas de liberación, en un tiempo de 15 días en la figura 4.25. Las muestras de titanio solo con nanotubos permanecieron a la cabeza al llegar más rápido a su estabilización de liberación, al igual que el ensayo de TH no hubo mucho cambio respecto a las gráficas anteriores permanecieron por debajo de los nanotubos, pero esta vez se obtuvo un pequeño escalonamiento de liberación, en cambio en los ensayos de películas las TP son las que tiene la peor liberación ya que siguió siendo desigual, pero empeorando el sistema a más largo tiempo de liberación. Las muestras de TiNi, el sistema TNH siguió quedando a la cabeza con una liberación inicial rápida pero controlable a lo largo todo el ensayo. La muestra de TiNi solo con nanotubos siguió muy parecido a la liberación TNH, pero con volúmenes mayores de liberación. El sistema TNP siguió sin tener una mejora generando una liberación en 10000 minutos una serie de liberaciones mayores y desiguales.

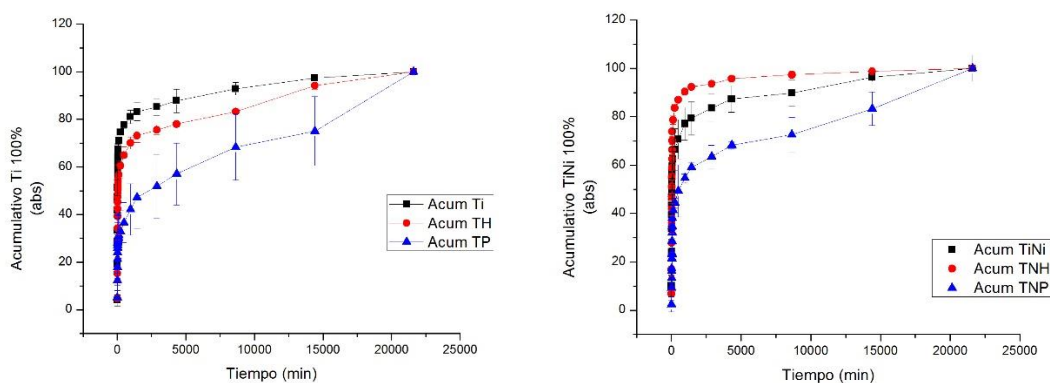


Figura 4.25 Comparación de sistemas de liberación Ti y TiNi, Nanotubos-MTX, Nanotubos-MTX-Nanofibras y Nanotubos-MTX-Película en un tiempo de 15 días.

Por ultimo en esta comparativa de perfiles de liberación se presentan los perfiles de liberación en un tiempo de 30 días, como se observa en la figura 4.26. En el caso de las muestras de titanio, en el primer sistema de solo los nanotubos la liberación fue constante en todo el ensayo solo con una ligera inclinación ascendente en los tiempos de 25000 minutos en adelante, por parte de las muestras hiladas TH, estas presentaron liberaciones parecidas a al sistema solo nanotubos pero al llegar al minuto 20000 en adelante las muestras comenzaron a liberar mayores cantidades fármaco, generando una segunda liberación intensa, la cual podría ser causada por el deterioro del sistema, ahora bien, en el sistema TP se tuvieron momentos de una liberación inicial seguido de una intensa liberación estable pero pasando los 10000 minutos se obtuvo una segunda liberación en el intervalo de 15000 hasta al 30000 min, de un volumen semejante a la liberación inicial y después del minuto 30000 un intento de estabilización constante en la liberación, que no llego a ser, debido a una tercera liberación intensa de volumen a partir del minuto 40000. En el caso de las muestras de titanio-níquel antes de los 20000 minutos tuvieron el mismo comportamiento que las gráficas anteriores, pasando ese lapso de tiempo los tres sistemas presentaron una estabilidad conjunta, ya que tuvieron perfiles muy parecidos a lo largo de 20000 a 50000 minutos, aunque el sistema de TNP ya que contaba con barras de error grandes. Las muestras TNH siguió constante, a su vez las muestras de Ti y TiNi presentaron perfiles muy parecidos, es notable la mejoría que se le dio al perfil con nanofibras situándose hasta arriba de una liberación constante y controlada. También se atribuye que a partir de un lapso de tiempo todos presentan una

liberación similar esto es porque todos presentan la misma morfología nanotubos, las muestras con películas como en los anteriores de los casos presentaron escalonamientos debido a la degradación de sus películas no uniformes generando volúmenes desiguales de liberación en tiempos prolongados y poco replicables en comparación de todos las demás. En el caso de las muestras de TH se presenta una liberación constante pero con un volumen gradualmente mayor con el paso del tiempo a comparación del perfil de TNH, esto es bueno dependiendo de cómo se quiera usar el sistema de liberación, un punto en contra que se observó en todas las muestras es un incremento de volumen liberación a los 20 días en adelante, ya que la líneas horizontales presentan una pendiente no tan pronunciada, esto se le atribuye a la degradación de las nanofibras, las películas y los nanotubos en lapsos prolongados de tiempo.

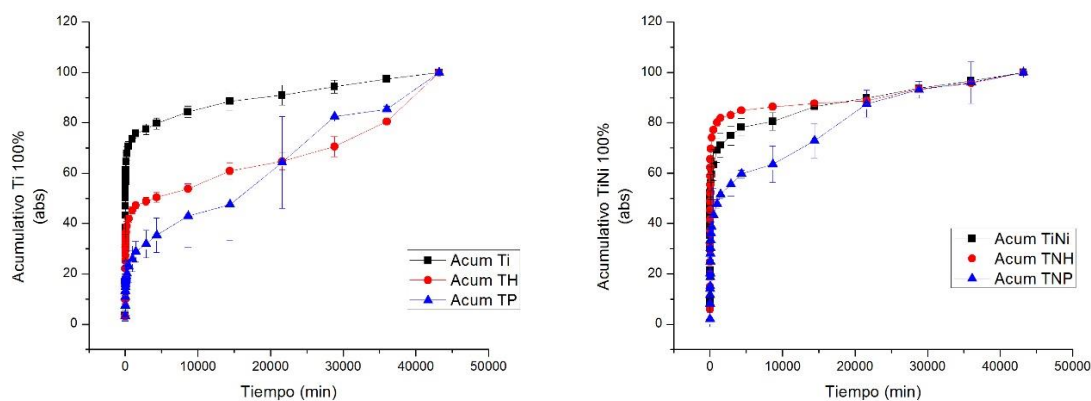


Figura 4.26 Comparación de sistemas de liberación Ti y TiNi, Nanotubos-MTX, Nanotubos-MTX-Nanofibras y Nanotubos-MTX-Película en un tiempo de 30 días.

4.12 Morfologías de nanotubos, nanofibras y película polimérica de un mes de liberación.

Por ultimo en este apartado de resultados, se presenta las morfologías de las muestras después de la liberación de 30 días como se observa en la Figura 4.27, El sistema de liberación de Nanotubos-MTX (A) permaneció con nanotubos como se puede apreciar en la figura 4.28. El sistema de liberación Nanotubos-MTX-Nanofibras (B) permaneció sin alteración en su morfología inicial de experimentación, en cambio el sistema de liberación Nanotubos-MTX-Película (C) presenta una degradación desproporcional, generando plastas de polímero al momento de tomar la muestra, teniendo como resultado regiones desiguales de la película polimérica. Las estructuras nanotubulares permanecieron después de la liberación, aunque se aprecian colapsados, este cambio morfológico es el causante en el aumento final de volumen de fármaco liberado que presentaron todas las muestras.

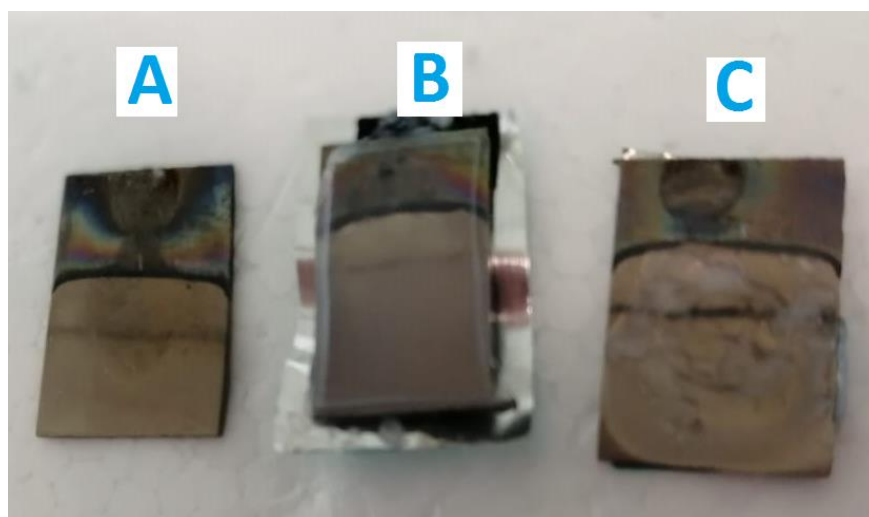


Figura 4.27 Sistemas de liberación después de 30 días de experimentación A) Nanotubos-MTX, B) Nanotubos-MTX- Nanofibras, C) Nanotubos-MTX-Película.

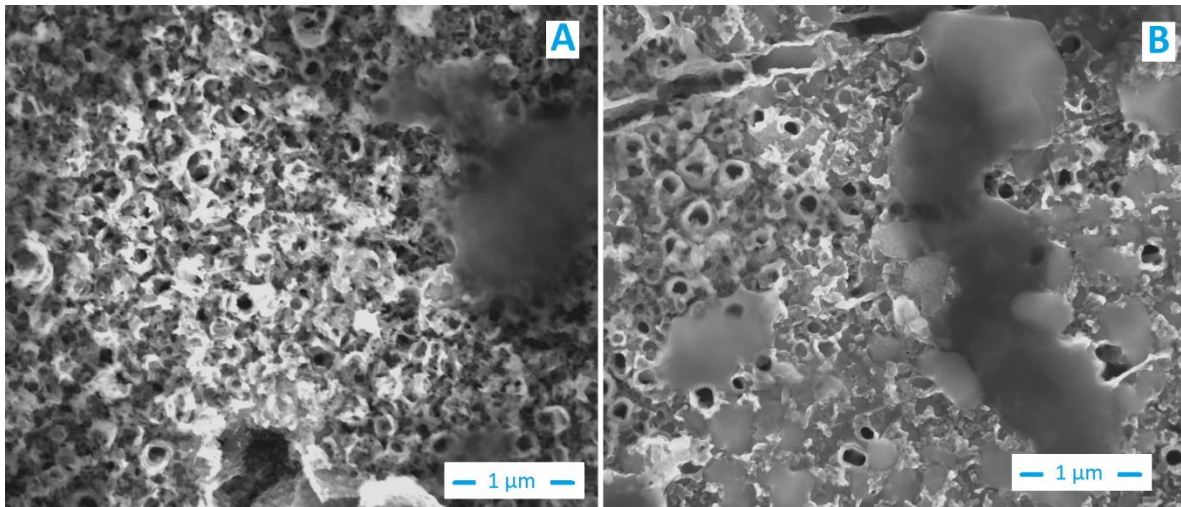


Figura 4.28 Sistemas de liberación Nanotubos-MTX después de 30 días de liberación del fármaco, A) Titanio, B) TiNi (imágenes realizadas por SEM).

4.13 Referencias

- [1]. Ruiqiang Hang, Yanlian Liu, Lingzhou Zhao, Ang Gao, Long Bai Fabrication of Ni-Ti-O nanotube arrays by anodization of NiTi alloy and their potential applications. Scientific Reports volume4, Article number: 7547 (2014).
- [2]. Qiang Liu, Dongyan Ding, Congqin Ning Anodic Fabrication of Ti-Ni-O Nanotube Arrays on Shape Memory Alloy. Institute of Microelectronic Materials and Technology, School of Materials Science and Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China. Materials 2014, 7(4), 3262-3273 22 April 2014
- [3]. Hua Song, Kai Cheng, Haifeng Guo, Fang Wang, Junlei Wang, Ningfang Zhu, Mingxing Bai, Xueqin Wang, Effect of ethylene glycol concentration on the morphology and catalytic properties of TiO₂ nanotubes Catalysis Communications 2017, 23-26.
- [4]. Qun Wang, Jian-Ying Huang, Hua-Qiong Li, Allan Zi-Jian Zhao, Yi Wang, Ke-Qin Zhang, Hong-Tao Sun and Yue-Kun Lai, Recent advances on smart TiO₂ nanotube platforms for sustainable drug delivery applications Int J Nanomedicine. 2017; 12: 151–165.
- [5]. Md. Mahmudul Alam, Hwa Seung Han, Shijin Sung, Jin Hee Kang, Keum Hee Sa, Hasan Al Faruque, Jungwan Hong, Eon Jeong Nam, In San Kim, Jae Hyung Park, Young Mo Kang. Endogenous inspired biomineral-installed hyaluronan nanoparticles as pH-responsive carrier of methotrexate for rheumatoid arthritis. Journal of Controlled Release. 6 March 2017.
- [6]. Magnani M. Drug delivery and targeting system. Emerg Ther Targets. 1998;2(1):145-146. doi:10.1517/14728222.2.1.145.
- [7]. Methotrexate chemical datasheet
<https://cameochemicals.noaa.gov/chemical/20602>
- [8]. Goeun Choi, Tae-Hyun Kim, Jae-Min Oh, Jin-Ho Choy, Emerging nanomaterials with advanced drug delivery functions; focused on methotrexate delivery Coordination Chemistry Reviews Volume 359, 15 March 2018, Pages 32-51
- [9]. Sang H, Gyoung T, Gwan T. Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. Adv Drug Deliv Rev. 2009.
- [10]. Uzun SD, Kayaci F, Uyar T, Timur S, Toppare L. Bioactive Surface Design Based on Functional Composite Electrospun Nanofibers for Biomolecule Immobilization and Biosensor Applications. 2014.
- [11]. Feng XJ, Macak JM, Albu SP, Schmuki P. Electrochemical formation of self-organized anodic nanotube coating on Ti-28Zr-8Nb biomedical alloy surface. Acta Biomater. 2008.
- [12]. Gulati, K., Aw, M. S., & Losic, D. (2011) Drug-eluting Ti wires with titania nanotube arrays for bone fixation and reduced bone infection. Nanoscale Research Letters, 6(1), 571. <http://doi.org/10.1186/1556-276X-6-571>
- [13]. Losic D, Simovic S: Self-ordered nanopore and nanotube platforms for drug delivery applications. Expert Opin Drug Deliv 2009, 6:1363-1380.

- [14]. T. López, E. Ortiz, P. Quintana, R.D. González, A nanostructured titania bioceramic implantable device capable of drug delivery to the temporal lobe of the brain, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Volume 300, Issues 1–2, 1 June 2007, Pages 3-10, ISSN 0927-7757, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.10.060>.
- [15]. Bhardwaj N, Kundu SC. *Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique*. 2010.
- [16]. Deitzel J., Kleinmeyer J, Harris D, Beck Tan N. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer (Guildf)*. 2001.
- [17]. Poly(n-isopropylacrylamide): experiment, theory and application h. G. Schild matermls research laboratory, polaroid corporation, 750m-c main street, cambridge, ma 02139, u.s.a.
- [18]. Shokuhfar T, Sinha-Ray S, Sukotjo C, Yarin AL. Intercalation of anti-inflammatory drug molecules within TiO₂ nanotubes. *RSC Adv*. 2013.
- [19]. Gulati, K., Kant, K., Findlay, D., & Losic, D. (2015). Periodically tailored titania nanotubes for enhanced drug loading and releasing performances. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(12), 2553-2559.
- [20]. Harsha, K.S.S., *Principle of vapor deposition of thin film*. Elsevier. Vol. 1. 2006.
- [21]. [Aw MS, Gulati K, Losic D. Controlling Drug Release from Titania Nanotube Arrays Using Polymer Nanocarriers and Biopolymer Coating. *J Biomater Nanobiotechnol*. 2011;02(05):477-484. doi:10.4236/jbmb.2011.225058.
- [22]. Anahita Fathi Azarbayjani, Jayarama Reddy Venugopal, Seeram Ramakrishna, Perry Fung Chye Lim, Yew Weng Chan³, Sui Yung Chan, Smart Polymeric Nanofibers for Topical Delivery of Levothyroxine *J Pharm Pharmaceut Sci* (www.cspcCanada.org) 13(3) 400 - 410, 2010.
- [23]. Kaiyong Cai, Feng Jiang, Zhong Luo and Xiuyong Chen, Temperature-Responsive Controlled Drug Delivery System, Based on Titanium Nanotubes *ADVANCED ENGINEERING MATERIALS* 2010, 12, No. 9.

5. CONCLUSIONES

Se logró realizar un sistema de liberación de metotrexato, conformado por una parte orgánica (nanofibras poliméricas) e inorgánica (nanotubos de titanio). Demostrando que las nanofibras poliméricas retardan la liberación y la modulación del fármaco a comparación de las películas.

Se logró funcionalizar la superficie de Titanio puro y la aleación de TiNi con estructuras nanotubulares, mediante la técnica de anodización empleando una solución electrolítica de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y NH_4F a voltajes constantes de 50 V durante 2 horas a temperatura ambiente.

Mediante la técnica de caracterización SEM fue posible caracterizar la morfología y dimensiones de las estructuras nanotubulares. El análisis realizado mostró que el diámetro y la longitud media de los nanotubos aumentaron casi linealmente mediante la variación del voltaje aplicado.

Las aleaciones anodizadas tienen la capacidad de carga-liberación del fármaco metotrexato, se observó que el anodizado de 50 V presentó un alto contenido de carga de fármaco por lo que el proceso de liberación fue más prolongado y constante.

Los perfiles de liberación de Nanotubos-Metotrexato presentaron una liberación constante y controlada en un tiempo de 30 días, se tuvo una fase rápida de liberación inicial en un tiempo de 15 min, que paso a ser a una liberación controlada en lo que continuo la experimentación, debido a la morfológica que presentaban los nanotubos respecto al tamaño del fármaco.

Se logró sintetizar nanofibras mediante la solución polimérica de PVA/PNIPAM en una relación 4:1, generando diámetros de 125-250nm por fibras, mediante la técnica de electrohilado a una distancia de 10cm de colector a aguja en tiempos de 1 hr.

Fue posible el electrohilar nanofibras poliméricas utilizando una matriz de nanotubos de titanio/TiNi como colector para poder tener una plataforma de liberación compleja el cual abarca el uso de dos nanoestructuras para poder modular la liberación del fármaco hacia el medio de reacción.

Se logró encapsular las estructuras nanotubulares cargas con MTX mediante una película polimérica (PVA/PNIPAM) creando otra variante del sistema de liberación propuestos.

Fue posible realizar perfiles de liberación mediante el sistema de Nanotubos-MTX-Nanofibras, presentaron una liberación constante y controlada mediante una liberación de 30 días, se disminuyó la fase de liberación inicial en cuestión de volumen liberado del fármaco presente y también se obtuvo una disminución al cambio que presenta la fase inicial a una fase más controlada dando desde un inicio una liberación más constante y controlada, a comparación del sistema de liberación Nanotubos-Metotrexato.

El sistema de liberación Nanotubos-MTX-Película, presentó una serie de irregularidades en liberación del fármaco constante, dando volúmenes desiguales, debido a la película polimérica presenta defectos en la morfología causados por la degradación en el medio de PBS, y en consecuencia generando un sistema no controlado, pero cabe de resaltar que generan un volumen mayor de liberación en el mismo lapso de tiempo (30 días) a comparación de dicho dos sistemas anteriormente mencionados.

En la comparación de los 6 perfiles de liberación en una 1hr, los sistemas de liberación que presentan la mejor liberación en cuestión de llegar en menor tiempo a una liberación constante son los Nanotubos-MTX y Nanotubos-MTX-Nanofibra.

Los sistemas de liberación de Nanotubos-MTX-Película, se presentan como los peores sistemas de liberación aunado que no son controlados, ya que tienen un mayor volumen de liberación de fármaco y un descontrol de dichas cantidades en diferentes tiempos, también son pocos repetibles teniendo barras de error muy grandes, cabe resaltar que estos sistemas de liberación podría ser usados cuando se necesite liberar grandes cantidades por un largo tiempo y en cantidades en aumento de fármaco.

En la comparación final del experimento de los 6 perfiles de liberación de 30 días, se concluye que el sistema que se mantiene mejor control a lo largo de todo el experimento, una constante liberación de cantidades pequeñas del metotrexato suministrada en cada uno de los puntos tomados, el sistema que disminuye la liberación inicial y uno de los sistemas con mayor índice de repetición, son los que presenta el arreglo de Nanotubos-MTX-Nanofibras.

Un punto importante de resaltar es que todos los sistemas presentaron una liberación por tiempos prolongados de 30 días, en este caso se buscó el mejor sistema que tuviera una liberación controlada y constante, cada uno de los sistemas propuestos aquí se puede adaptar

dependiendo de las necesidades que uno busca en aplicación de los fármacos, como grandes cantidades en prolongados tiempos o incremento gradual en administración de fármacos.

Otro punto importante es que los sistemas de liberación presentaron liberación por más de 2 meses, pero debido a que la replicación de la experimentación se tuvo que recortar en un estándar de 1 mes.

Todos los sistemas de liberación presentaron una degradación superando los 20 días, suministrando un poco más de volumen en cada uno de los casos. Esto se parecía en la pérdida de la morfología de nanotubos y degradación de las matrices poliméricas.

En el Ti como en el TiNi los resultados fueron satisfactorios en cuanto a la liberación del fármaco, que es lo que abarca el presente estudio. Sin embargo, se propone continuar con la aleación de TiNi para el diseño de un prototipo de injerto con el MTX cargado y con nanofibras. Se propone el TiNi sobre el Ti por sus propiedades mecánicas, por su módulo elástico más compatible con el del hueso que el del Ti, por sus propiedades de memoria de forma o superelásticidad que permitirán un diseño apropiado para interactuar con la estructura ósea, mejorando las deformidades que pudiera causar la AR, aunado al efecto del MTX liberado localmente.